



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**ÓLEO ESSENCIAL DE ACESSOS DE *Varronia curassavica*
(CORDIACEAE) COMO POTENCIAL AGENTE DE
BIOCONTROLE SOBRE *Phytomonas serpens***

KLEITON PAULO SILVA

2019



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

KLEITON PAULO SILVA

**ÓLEO ESSENCIAL DE ACESSOS DE *Varronia curassavica* (CORDIACEAE) COMO
POTENCIAL AGENTE DE BIOCONTROLE SOBRE *Phytomonas serpens***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

Orientadora
Prof^ª. Dr^ª. Roberta Pereira Miranda Fernandes

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2019

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S586o Silva, Kleiton Paulo
Óleo essencial de acessos de *Varronia curassavica* (Cordiaceae) como potencial agente de biocontrole e sobre *Phytomonas serpens* / Kleiton Paulo Silva ; orientadora Roberta Pereira Miranda Fernandes. – São Cristóvão, SE, 2019.
41 f. ; il.

Dissertação/Tese (Mestrado/Doutorado em Agricultura e Biodiversidade) – Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe, 2019.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Roberta Pereira Miranda Fernandes

1. Erva-baleeira. 2. Plantas medicinais. 3. Fitomonas. 4. Tripanossomatídeo. 5. *Solanum lycopersicum*. I. Fernandes, Roberta Pereira Miranda, orient. II. Título.

CDU: 633.88

KLEITON PAULO SILVA

**ÓLEO ESSENCIAL DE ACESSOS DE *Varronia curassavica* (CORDIACEAE) COMO
POTENCIAL AGENTE DE BIOCONTROLE SOBRE *Phytomonas serpens***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2019.

Prof. Dr. Ricardo Scher
Universidade Federal de Sergipe - UFS

Prof. Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral
Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz



Prof^a. Dr^a. Roberta Pereira Miranda Fernandes
Universidade Federal de Sergipe
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

*Aos meus pais José Maria da Silva Carmo e
Maria Tereza Paulo Silva, principais
formadores de caráter e educação, amores
verdadeiros por toda a vida.*
Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente, por ter me dado força para superar minhas dificuldades e pela oportunidade de realizar meus sonhos.

Aos meus pais, por todo o incentivo e dedicação de forma incondicional, que se sacrificaram para que eu chegasse aqui.

À Universidade Federal de Sergipe - UFS, ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade (PPGAGRI) e seu corpo docente, direção e administração, por terem sido os responsáveis pelo meu conhecimento acadêmico teórico e prático, além de outros ensinamentos que serão utilizados na minha vida profissional e por todo meu cotidiano.

À minha orientadora de mestrado, professora Roberta Pereira Miranda Fernandes, pelas orientações, puxões de orelha, conselhos de várias formas, não somente de vida acadêmica, tendo a importância de uma segunda mãe como orientadora, onde pelo pouco tempo que passei pelas suas mãos, fui gratificado com tamanho conhecimento para a minha vida profissional e acadêmica.

Aos meus amigos do laboratório de Enzimologia, Brenda Moutinho, Isabela Vasconcelos, Mayara Mendes, Tamires Carvalho e Rafael Salomão, sem vocês o dia a dia de trabalho não seria o mesmo, não teria graça, não teria risos, nem dedicação, e eu digo: todos contribuíram enormemente para que eu chegasse neste ponto de conclusão, TODOS! E a todos sou muito agradecido. Obrigado, de nada.

Aos professores Cristiane Bani e Ricardo Scher pela coorientação e conselhos que auxiliaram no desenvolvimento do meu trabalho, além da paciência no transmitir de conhecimento e na sanção de minhas dúvidas, vocês sempre serão responsáveis pelo engrandecimento deste trabalho.

E a todos os parceiros de laboratório, colegas, alunos de iniciação científica, técnicos de laboratório, pós-graduandos e professores, que direta ou indiretamente fizeram parte e contribuíram com a minha formação e nossa pesquisa, o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Família dos Tripanossomatídeos	2
2.2. Gênero <i>Phytomonas</i>	3
2.3. <i>Phytomonas serpens</i>	4
2.4. Óleos essenciais	6
2.5. Mecanismos de ação dos OEs	7
2.6. <i>Varronia curassavica</i>	8
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
4. ARTIGO 1: ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Varronia curassavica</i> (CORDIACEAE) COMO POTENCIAL AGENTE DE BIOCONTROLE SOBRE <i>Phytomonas serpens</i>	16
Resumo	16
Abstract	17
4.1. Introdução	17
4.2. Material e Métodos	18
4.2.1. Material vegetal	18
4.2.2. Extração dos óleos essenciais	19
4.2.3. Análise química do óleo essencial	19
4.2.4. Manutenção e cultivo de promastigotas de <i>Phytomonas serpens</i>	19
4.2.5. Atividade dos óleos essenciais de <i>Varronia curassavica</i> em promastigotas de <i>Phytomonas serpens</i>	19
4.2.6. Curva de crescimento de promastigotas de <i>Phytomonas serpens</i> na presença de diferentes concentrações do OEVC-202	20
4.2.7. Análise dos níveis de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em promastigotas de <i>Phytomonas serpens</i>	20
4.2.8. Análise da integridade da membrana plasmática de promastigotas de <i>Phytomonas serpens</i>	20
4.2.8.1. Espectrofotometria de fluorescência	20
4.2.8.2. Microscopia de fluorescência	21
4.2.9. Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de promastigotas de <i>Phytomonas serpens</i>	21
4.2.10. Análise estatística	21
4.3. Resultados e discussão	21
4.3.1. Análise química do óleo essencial de <i>Varronia curassavica</i>	21
4.3.2. Atividade dos óleos essenciais de <i>Varronia curassavica</i> sobre a viabilidade de promastigotas de <i>Phytomonas serpens</i> – <i>In vitro</i>	22
4.3.3. Análise dos níveis de produção de espécies reativas de oxigenio (ROS) em promastigotas de <i>Phytomonas serpens</i>	22
4.3.4. Avaliação da integridade da membrana celular de promastigotas de <i>Phytomonas serpens</i>	23
4.3.5. Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	23
4.4. Conclusões	24
4.5. Agradecimentos	24

4.6. Financiamento	24
4.7. Referências	24
Figuras e Tabelas	29

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representação da morfologia dos tripanossomatídeos	2
2	Desenho ilustrativo do polimorfismo da <i>Phytomonas serpens</i> : 1 e 2, formas de selva do fruto; 3 e 4, flagelados de meio bifásico ágar-sangue/LIT; 5 e 6, formas alongadas de fase estacionária de meio de cultura LIT; 7 e 8, formas não flageladas de urina de vetores hemípteros; 9 e 10, flagelados do trato digestivo de vetor	3
3	Fotos dos insetos fitófagos <i>Nezara viridula</i> (A) e <i>Phthia picta</i> (B)	5
4	Tomate infectado por <i>Phytomonas serpens</i>	6
5	Planta de <i>Varronia curassavica</i> (A), inflorescência (B) e frutos (C)	8

ARTIGO 1

Figura		
1	Efeito do OE de <i>Varronia curassavica</i> , genótipo VC-202, nas concentrações IC ₅₀ , 2xIC ₅₀ e 4xIC ₅₀ sobre a curva de crescimento de promastigotas de <i>Phytomonas serpens</i> . Dados representados pela média ± E.P em experimentos realizados em triplicata em três dias independentes. *p < 0.05, **p < 0.01 e ***p < 0.001. (Two-way ANOVA com teste de Tukey)	35
2	Avaliação do efeito permanente na proliferação celular em promastigotas de <i>Phytomonas serpens</i> tratadas com IC ₅₀ , 2xIC ₅₀ e 4xIC ₅₀ do óleo essencial de <i>Varronia curassavica</i> , genótipo VC-202, comparadas com o controle. Dados representados pela média ± E.P em experimentos realizados em triplicata em três dias independentes. *p < 0.05, **p < 0.01 e ***p < 0.001. (Two-way ANOVA com teste de Tukey)	36
3	Níveis de produção de Espécies Reativas a Oxigênio (ROS) em promastigotas de <i>Phytomonas serpens</i> tratadas com IC ₅₀ , 2xIC ₅₀ e 4xIC ₅₀ do óleo essencial de <i>Varronia curassavica</i> , genótipo VC-202, comparados com o controle. Dados de média de fluorescência relativos ao controle negativo, representados pela média ± E.P em experimentos realizados em triplicata em três dias independentes. *p < 0.05, **p < 0.01 e ***p < 0.001. (two-way ANOVA com teste de Tukey)	37
4	Intensidade da fluorescência em promastigotas de <i>Phytomonas serpens</i> tratadas com a IC ₅₀ e 2xIC ₅₀ do óleo essencial de <i>Varronia curassavica</i> , genótipo VC-202, marcadas com iodeto de propídio (PI). Células incubadas no banho-maria (80°) foram usadas como controle positivo e células não tratadas como controle negativo. Dados de média de fluorescência relativos ao controle negativo, representados pela média ± E.P em experimentos realizados em triplicata em três dias independentes. *p < 0.05, **p < 0.01 e ***p < 0.001. (two-way ANOVA com teste de Tukey)	38
5	Imagens de microscopia (40x) de fluorescência de promastigotas de <i>Phytomonas serpens</i> tratadas com IC ₅₀ e 2xIC ₅₀ do óleo essencial de <i>Varronia curassavica</i> , genótipo VC-202. (A, B e C) Células tratadas com IC ₅₀ do óleo essencial de <i>Varronia curassavica</i> , genótipo VC-202, coradas com DAPI e iodeto de propídio (PI) com imagens sobrepostas (MERGE), respectivamente; (D, E e F) Células tratadas com 2xIC ₅₀ do óleo essencial de <i>Varronia curassavica</i> , genótipo VC-202, coradas com DAPI e iodeto de propídio (PI) com imagens sobrepostas (MERGE), respectivamente; (G, H e I) Células mortas em banho-maria (80°±10 min) coradas com DAPI e iodeto de propídio (PI) com imagens sobrepostas (MERGE), respectivamente; (J, K e L) Células vivas coradas com DAPI e iodeto de propídio (PI) com imagens sobrepostas	

	(MERGE), respectivamente. Imagens representativas de três experimentos independentes	39
6	Imagem representativa da região da população de promastigotas de <i>Phytomonas serpens</i> (FSC - Tamanho x SSC - Granulosidade) tratadas com IC ₅₀ , 2xIC ₅₀ e 4xIC ₅₀ do óleo essencial de <i>Varronia curassavica</i> , genótipo VC-202. (A) Células vivas (Sem Rh123); (B) Controle negativo; (C) Células tratadas com CCCP; (D) Células tratadas com IC ₅₀ do óleo essencial de <i>Varronia curassavica</i> , genótipo VC-202; (E) Células tratadas com 2xIC ₅₀ do óleo essencial de <i>Varronia curassavica</i> , genótipo VC-202; (F) Células tratadas com 4xIC ₅₀ do óleo essencial de <i>Varronia curassavica</i> , genótipo VC-202. Imagens representativas de três experimentos independentes	40
7	Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de promastigotas de <i>Phytomonas serpens</i> tratadas com a IC ₅₀ , 2xIC ₅₀ e 4xIC ₅₀ do óleo essencial de <i>Varronia curassavica</i> , genótipo VC-202 e CCCP, comparados com Controle Negativo e coradas com Rodamina 123 (Rh123)	41

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Detecção e isolamento de tripanossomatídeos em plantas	4
 ARTIGO 1		
Tabela		
1	Composição química do óleo essencial de sete genótipos de <i>Varronia curassavica</i> (%)	31
2	Atividade antiprotozoária dos óleos essenciais de sete genótipos de <i>Varronia curassavica</i> em promastigotas de <i>Phytomonas serpens</i> com valores das IC ₅₀ (µg/mL)	33
3	Avaliação do Índice de variação (IV) para analisar o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de promastigotas de <i>Phytomonas serpens</i> tratadas com óleo essencial de <i>Varronia curassavica</i> , genótipo VC-202, e coradas com Rodamina 123 (Rh123)	34

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

OE Óleo essencial
OEVC Óleo essencial de *Varronia curassavica*
DMSO Dimetilsulfóxido
PBS Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato-salino)
B.O.D. Biochemical Oxygen Demand (Demanda Bioquímica de Oxigênio)
PI Propidium Iodide (Iodeto de Propídeo)
Rh123 Rhodamine 123
CCCP (Carbonil cianeto 4-clorofenilhidrazona)
ROS Reactive Oxygen Species (Espécie Bioquímica de Oxigênio)
BAG Banco Ativo de Germoplasma
SisGen Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
Fiocruz Fundação Oswaldo Cruz
UFS Universidade Federal de Sergipe
DAPI 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride
SFB Soro bovino fetal

RESUMO

SILVA, Kleiton Paulo. **Óleo essencial de acessos de *Varronia curassavica* (cordiaceae) como potencial agente de biocontrole sobre *Phytomonas serpens***. São Cristóvão: UFS, 2019. 41p. (Dissertação– Mestrado em Agricultura e Biodiversidade). *

Os protozoários do gênero *Phytomonas* são responsáveis por diversas doenças em culturas agrícolas de grande importância econômica, no entanto ainda não existe nenhum tipo de controle registrado para esses fitopatógenos. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiprotozoária do óleo essencial (OE) de sete genótipos de *Varronia curassavica* e seus efeitos morfofisiológicos sobre as formas promastigotas de *Phytomonas serpens*. A análise química dos óleos essenciais por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa CG-MS dos genótipos VC-002, VC-104, VC-202, VC-302, VC-303, VC-601 e VC-701, demonstrou que α -pineno (56,69%), 7-ciclododecen-1-ona,7-metil-3-metileno-10-(1-propil) (48,63%), Germacreno D-4-ol (32,16%), ar-curcumeno (20,37%),7-ciclododecen-1-ona,7-metil-3-metileno-10-(1-propil) (19,32%), trans-cariofileno (21,78%) e ar-turmerona (28,36%) são os compostos majoritários para cada genótipo, respectivamente. Todos os OEs demonstraram atividade antiprotozoária, sendo o genótipo VC-202 o que apresentou a menor IC₅₀ (14 μ g/mL), além de possuir ação permanente sobre *P. serpens*. As imagens obtidas em microscopia de fluorescência e os dados de fluorescência obtidos utilizando o Iodeto de Propídio (PI) por espectrofotometria, demonstraram que houve alterações celulares com permeabilização na membrana citoplasmática. Através da citometria de fluxo, foi demonstrado que ocorreu perda no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) das células tratadas. Os óleos essenciais de *V. curassavica* possuem grande variabilidade química e demonstraram atividade antiprotozoária sobre *P. serpens*. Até o presente momento não há relatos da atividade de OEs sobre fitomonas, sendo assim o óleo essencial do genótipo 202 é uma potencial fonte de matéria bruta para formulação de bioprodutos para o controle de fitomonas.

Palavras-chave: Erva-baleeira, plantas medicinais, tripanossomatídeo, fitomonas, *Solanum lycopersicum*.

* Comitê Orientador: Roberta Pereira Miranda Fernandes – UFS (Orientadora).

ABSTRACT

SILVA, Kleiton Paulo. **Using of *Varronia curassavica* (Cordiaceae) essential oil in the biocontrol of *Phytomonas serpens***. São Cristóvão: UFS, 2019. 41p. (Thesis – Master of Science in Agriculture and Biodiversity). *

The protozoa of the genus *Phytomonas* cause diseases in crops of agricultural and economic importance, however, there is still no control registered for these phytopathogens. The objective of this research was to evaluate the antiprotozoal activity of essential oil (EO) from seven *Varronia curassavica* genotypes and its morphophysiological effects on *Phytomonas serpens* promastigotes forms. The chemical analysis of the essential oils by gas chromatography with mass spectrometer GC-MS of the genotypes VC-002, VC-104, VC-202, VC-302, VC-303, VC-601 and VC-701, demonstrated that α -Pinene (56,69%), 7-Cyclodecen-1-ona.7-methyl-3-methylene-10-(1-propyl) (48,63%), Germacrene D-4-ol (32,16%), ar-Curcumene (20,37%), 7-Cyclodecen-1-ona.7-methyl-3-methylene-10-(1-propyl) (19,32%), E-Caryophyllene (21,78%) e ar-Turmerone (28,36%) are the major compounds for each genotype, respectively. All the EO demonstrated antiprotozoal activity and the genotype VC-202 presented the lower IC₅₀ (14 μ g/mL), presenting permanent effect against *P. serpens*. The images obtained in fluorescence microscopy and the data from fluorescence spectrophotometry using Propidium Iodide (PI), demonstrated cell alterations with permeabilization in cytoplasmic membrane. Through flow cytometry, it was demonstrated loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in EO treated cells. The EO of different *V. curassavica* genotypes presented wide chemical variability and demonstrated antiprotozoal activity against *P. serpens*. Until the present moment, there are not reports about EOs activity against *Phytomonas*, therefore, the EO of genotype 202 is a potential source of raw material for formulations of bioproducts for *Phytomonas* control.

Key-words: Erva-baleeira, medicinal plants, trypanosomatid, *Phytomonas*, *Solanum lycopersicum*.

* Supervising Committee: Roberta Pereira Miranda Fernandes – UFS (Orientador).

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os protozoários do gênero *Phytomonas*, pertencente à Família Trypanosomatidae, são causadores de diversas doenças em plantas tropicais de importância agrícola, tais como, coqueiro (*Cocos nucifera*), dendezeiro (*Elaeis guineenses*), cafeeiro (*Coffea* sp), mandioca (*Manihot esculenta*), entre outras (JASKOWSKA et al., 2015). Nenhuma das doenças de plantas causadas por esses protozoários possui controle químico registrado, sendo as únicas alternativas para manejo desses fitopatógenos a eliminação da planta, o controle dos insetos vetores e técnicas de manejo da cultura. Algumas espécies de *Phytomonas* causam doenças que trazem perdas totais para a cultura cultivada na área quando não controladas no início da manifestação da doença.

No estado do Amazonas - Brasil, em 2001, foi constatada a presença de diversas plantas de coqueiro infectadas com *Phytomonas staheli*, sendo a doença identificada em sete municípios, atingindo cerca de 47% das plantações (ARAÚJO et al., 2003). No Espírito Santo – Brasil, foi confirmado o protozoário *Phytomonas françai* como causador da doença “chochamento das raízes” em plantas de mandioca, chegando a atingir 50% das plantas causando enormes perdas na produção (KITAJIMA et al., 1986).

Phytomonas serpens é uma espécie do gênero *Phytomonas* que possui versatilidade e facilidade para manuseio. A espécie *Phytomonas serpens*, primeiramente classificada com o nome *Leptomonas serpens*, foi isolada em frutos de tomates, descrita como uma espécie de alto polimorfismo (GIBBS 1957; JANKEVICIUS et al., 1989; BATISTOTI et al., 2001). Esses parasitos flagelados foram isolados também no trato digestivo e glândulas salivares de duas espécies de insetos hemípteros fitófagos *Phthia picta* e *Nezara viridula* (BATISTOTI et al., 2001; CAMARGO, 1999).

Os danos causados por *P. serpens* em tomate podem tornar o fruto menos viável para comercialização, tendo como consequência a perda na renda para o produtor. A maioria dos estudos sobre esse parasita são sobre suas características morfológicas, bioquímicas e moleculares, sendo os aspectos sobre a patogenicidade desses organismos ainda pouco explorados. No mercado ainda não há produtos registrados para o controle desse patógeno, tendo somente algumas pesquisas que estudam o seu controle. Com isso, há necessidade de pesquisas que desenvolvam produtos que possam ser usados no controle desses patógenos de plantas.

Muitos estudos têm sido realizados sobre a atividade biológica dos óleos essenciais, tais como inseticida, bactericida, virucida, fungicida, antiparasitária, citotóxica, cosmética, medicinal e em aplicações alimentares (BASILE et al., 2006; GOMES et al., 2013; GONÇALVES et al., 2012; LIU et al., 2006; BAKKALI et al., 2008; KYARIMPA et al., 2014). Assim, o uso dos óleos essenciais com ação inibitória de protozoários fitopatogênicos, como as fitomonas, tem um papel importante para a criação de produtos naturais para o controle de doenças de plantas.

A *Varronia curassavica* Jacq. - sinonímia *Cordia verbenacea* DC ou *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schults (erva-baleeira), pertencente à Família Boraginaceae, é utilizada na medicina popular devido às suas propriedades anti-inflamatória, analgésica e cicatrizante. A atividade antimicrobiana do óleo essencial da *V. Curassavica* também tem sido amplamente estudada, podendo-se citar a inibição de bactérias, larvas de mosquito e fungos patogênicos tanto para humanos como para plantas, e em protozoários (BRAGA et al., 2007; MICHIELIN et al., 2009; RODRIGUES et al., 2012; SANTOS et al., 2006).

O óleo essencial de *V. curassavica* possui uma grande diversidade em sua composição química e em sua atividade antimicrobiana, podendo ser utilizada no controle de diversos patógenos, inclusive em espécies do gênero *Phytomonas*. Com isso, o estudo da atividade inibitória de óleos essenciais da *V. curassavica* sobre a *P. serpens* pode contribuir para o desenvolvimento de um método de controle alternativo sobre diversos protozoários fitopatogênicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família dos Tripanossomatídeos

A Família Trypanosomatidae do Sub-Reino Protozoa, pertence ao Filo Euglenozoa, Classe Kinetoplastida, Ordem Trypanosomatida e Subordem Trypanosomatina (LEVINE et al., 1980). Essa família compreende um grande número de protozoários flagelados agrupados nos gêneros *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Rhynchoidomonas*, *Endotrypanum*, *Leishmania*, *Phytomonas* e *Trypanosoma*, sendo que posteriormente foram incluídos os gêneros, *Wallaceina*, *Sergeia*, *Angomonas* e *Strigomonas* (PODLIPAEV, 1986; PODLIPAEV, 2000; SVOBODOVÁ et al., 2007).

Esses gêneros compartilham características peculiares, porém nem sempre exclusivas da Família Trypanosomatidae, tais como (Figura 1): presença de um único flagelo, compartimentalização das primeiras reações da via glicolítica em organelas conhecidas como glicossomas, presença do cinetoplasto (MCGHEE; COSGROVE, 1980; VICKERMAN, 1994).

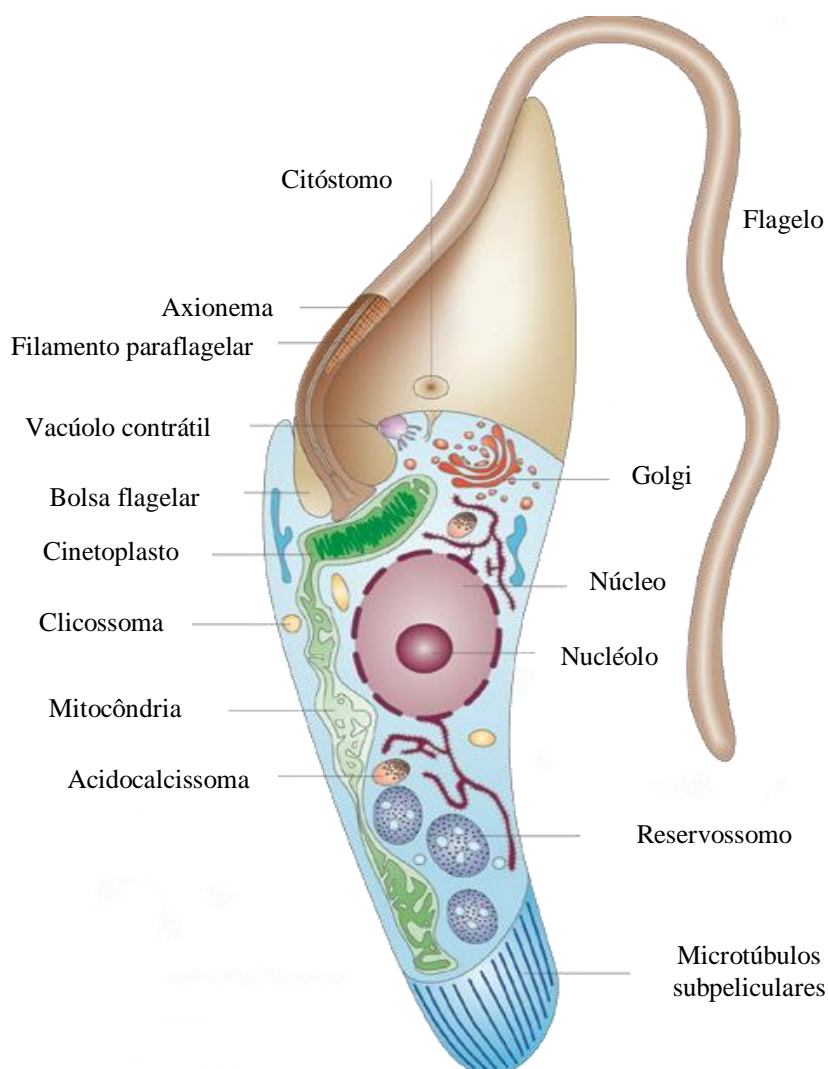


Figura 1. Representação da morfologia dos tripanossomatídeos.

Fonte: Adaptado de Elias (2009).

Os membros dessa família de protozoários são responsáveis por diversas doenças parasitárias de grande importância agropecuária e para a saúde humana. As doenças parasitárias, intestinais e não-intestinais, estão entre as mais dominantes do mundo, atingindo milhões de pessoas. Entre as doenças parasitárias não-intestinais mais importantes destacam-se

as causadas por parasitos dos gêneros *Trypanosoma* (doença de Chagas e doença do sono) e *Leishmania* (leishmaniose visceral, mucocutânea e cutânea) (MELOS; ECHEVARRIA, 2012).

2.2. Gênero *Phytomonas*

Além da importância para a saúde humana, a Família Trypanosomatidae possui também grande importância no setor agropecuário, já que algumas espécies são potencialmente patogênicas para as plantas e animais, causando prejuízos econômicos para esse setor. O gênero *Phytomonas* é um dos que possuem espécies de protozoários fitopatogênicos de importância agrícola (YAMADA-OGATTA et al., 2015).

Esse gênero possui parasitas heteróxeos que podem ser isolados no floema, dos tubos lactíferos, frutos ou sementes de várias famílias de plantas com ampla distribuição geográfica, de grande importância econômica e que são transmitidos por insetos fitófagos infectados e pertencentes às Famílias Coreidae, Lygaeidae, Pyrrhocoridae e Pentatomidae (SANTOS et al., 2007). As formas promastigotas, formas alongadas do parasita apresentando flagelo livre na extremidade anterior da célula e com cinetoplasto localizado na região anterior ao núcleo, presentes na saliva no momento da picada dos insetos, infectam as plantas (BATISTOTI et al., 2001).

A transmissão no inseto é propagativa e persistente, já que o inseto infectado possui as fitomonas em todo trato digestivo, hemolinfa e glândulas salivares (COSTA, 2006). Os parasitas em todo seu ciclo de vida estão sempre na forma promastigota, porém possuem alto grau de polimorfismo (Figura 2), isto é, seu tamanho, extensão do flagelo, forma do corpo celular e número de torções ao longo do corpo podem variar em diferentes meios de cultura e hospedeiros, sendo esse polimorfismo também encontrado na mesma cultura e no mesmo hospedeiro, mostrando uma enorme plasticidade (COSTA, 2006).

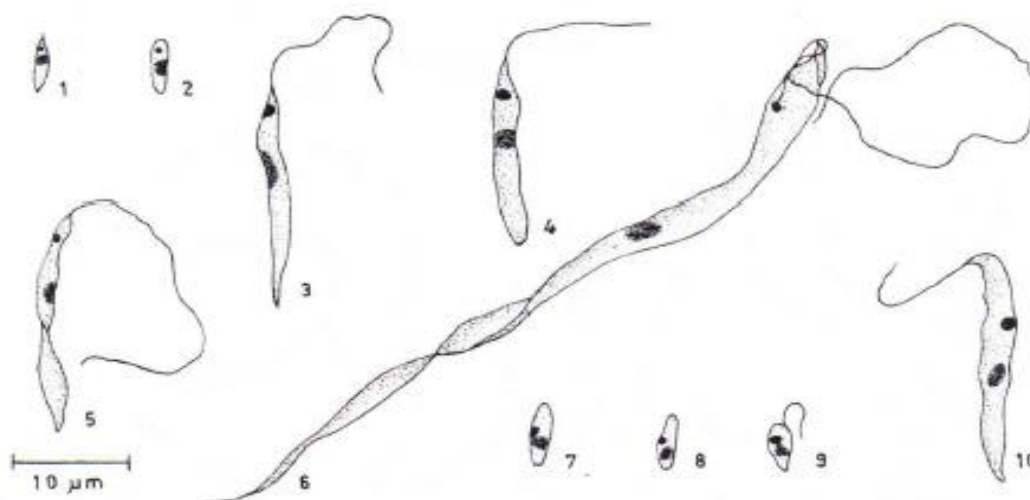


Figura 2. Desenho ilustrativo do polimorfismo da *Phytomonas serpens*: 1 e 2, formas de selva do fruto; 3 e 4, flagelados de meio bifásico ágar-sangue/LIT; 5 e 6, formas alongadas de fase estacionária de meio de cultura LIT; 7 e 8, formas não flageladas de urina de vetores hemípteros; 9 e 10, flagelados do trato digestivo de vetor.

Fonte: Jankevicius et al. (1989).

Com relação às características bioquímicas, espécies do gênero *Phytomonas* são capazes de converter amido e celulose em monossacarídeos, sendo utilizados como nutriente (YAMADA-OGATTA et al., 2015). Durante a fase de crescimento exponencial, esses microrganismos utilizam glicose como principal fonte de carbono e energia, gerando assim

etanol e acetato, principalmente como produtos finais do catabolismo (CHAUMONT et al., 1994).

Diversas espécies do gênero *Phytomonas* já foram relatadas em diferentes plantas, como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1. Detecção e isolamento de tripanossomatídeos em plantas.

Hospedeiro	Referências
Amora (<i>Morus</i> sp.)	Cavazzana et al., 1993.
Bergamota (<i>Citrus bergamia</i>)	Conchon et al., 1989.
Café (<i>Coffea arabica</i>)	Stahel, 1931; Felts, 1981.
Caju (<i>Anacardium occidentale</i>)	Conchon et al., 1989.
Carambola (<i>Averhoa carambola</i>)	Conchon et al., 1989.
Caruru (<i>Amaranthus retroflexus</i>)	Sánchez-Moreno et al., 1998.
Cherimolia (<i>Annona cherimolia</i>)	Sánchez-Moreno et al., 1995.
Coqueiro (<i>Cocos nucifera</i>)	Parthasarathy et al., 1976.
Espécies de <i>Euphorbia</i>	Attias e De Souza, 1986; Fiorini et al., 1993.
Feijão guandu (<i>Cajanus flavus</i>)	Cavazzana et al., 1993.
Jiló (<i>Solanum gilo</i>)	Fiorini et al., 1986.
Laranja (<i>Citrus aurantium</i>)	Fiorini et al., 1990; Carrara et al., 1992.
Leguminosas	Itow-Jankevicius et al., 1987.
Maçã (<i>Malus</i> sp.)	Cavazzana et al., 1995.
Mandioca (<i>Manihot palmata</i> ; <i>M. esculenta</i>)	Aragão, 1927; Vainstein et al., 1984.
Manga (<i>Mangifera indica</i>)	Sánchez-Moreno et al., 1998.
Milho (<i>Zea mays</i>)	Itow-Jankevicius et al., 1991.
Palmeira	Dollet et al., 1977.
Pêssego (<i>Prunus persica</i>)	Conchon et al., 1989.
Pitanga (<i>Eugenia</i> spp.)	Cavazzana et al., 1996.
Romã (<i>Punica granatum</i>)	Catarino et al., 1991.
Tangerina (<i>Citrus reticulata</i>)	Conchon et al., 1989.
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Gibbs, 1957; Fiorini et al., 1986, 1993; Jankevicius et al., 1989.; Sánchez-Moreno et al., 1995a.
<i>Trifolium glomeratum</i>	Sánchez-Moreno et al., 1998.
Urucum (<i>Bixa orellana</i>)	Almeida et al., 1990.
Uva (<i>Vitis vinifera</i>)	Carrara et al., 1992.

Fonte: Yamada-Ogatta et al. (2015).

Dependendo da espécie e da planta hospedeira, esses organismos podem ou não ter alguma patogenicidade para as plantas. Por exemplo, algumas espécies de *Phytomonas* foram encontradas infectando plantas de milho e leguminosas, mas sem patogenicidade para esses hospedeiros (YAMADA-OGATTA et al., 2015). As fitomonas começaram a despertar um interesse especial na comunidade científica quando se constatou que vários dos organismos desse gênero causavam diversas enfermidades em plantações de interesse econômico, tais como mandioca (“chochamento das raízes”), café (necrose do floema), coco (“*hartrot*”) e palmeiras produtoras de óleo (“*marchitez sorpressiva*”), principalmente na América Latina (DOLLET, 1984).

No estado do Amazonas - Brasil, em 2001, foi constatada a presença de diversas plantas de coqueiro infectadas com *Phytomonas staheli*, sendo a doença identificada em sete municípios, atingindo cerca de 47% das plantações (ARAÚJO et al., 2003). No Espírito Santo – Brasil, foi confirmado o protozoário *Phytomonas françai* como causador da doença “chochamento das raízes” em plantas de mandioca, chegando a atingir 50% das plantas causando enormes perdas na produção (KITAJIMA et al., 1986). É importante ressaltar que, nenhuma das doenças de plantas causadas por esses protozoários, possuem algum controle químico registrado, sendo as únicas alternativas para manejo desses fitopatógenos a eliminação da planta, o controle dos insetos vetores e técnicas de manejo da cultura adequadas.

2.3. *Phytomonas serpens*

Gibbs, em 1957, ao estudar seiva de tomates (*Lycopersicum sculentum*), encontrou vários flagelados de extremo polimorfismo, descrevendo-o como um tripanossomatídeo parasita exclusivo de tomate, denominando-o *Leptomonas serpens*, posteriormente reclassificado como *Phytomonas serpens* por Podlipaev (1986) (GIBBS, 1957; JANKEVICIUS et al., 1989). Os parasitos flagelados foram isolados tanto do tomate maduro quanto do trato digestivo e das glândulas salivares das duas espécies de insetos hemípteros fitófagos (*Phthia picta* e *Nezara viridula*), permitindo identificá-los como vetores naturais para *P. serpens* (ELIAS, 2009).

P. serpens se desenvolve tanto na planta quanto no inseto. Este fato foi verificado infectando experimentalmente insetos fitófagos *Phthia picta* e *Nezara viridula* (Figura 3), que são os principais transmissores do protozoário (COSTA, 2006; JANKEVICIUS, 1989.). Os insetos se alimentam dos tomates contaminados e se infectam após 10 a 15 dias, apresentando os parasitos no sistema digestivo e glândulas salivares. Formas promastigotas colonizam o trato digestivo dos insetos, atravessando o intestino e atingindo a face externa das glândulas salivares pela hemolinfa (COSTA, 2006; YAMADA-OGATTA et al., 2015; JANKEVICIUS, 1989). Quando ligados a essa superfície, esses parasitos atravessam o epitélio, alcançam o lúmen da glândula e assim são inoculados em frutos não infectados maduros através da saliva no momento da picada (YAMADA-OGATTA et al., 2015; JANKEVICIUS, 1989).

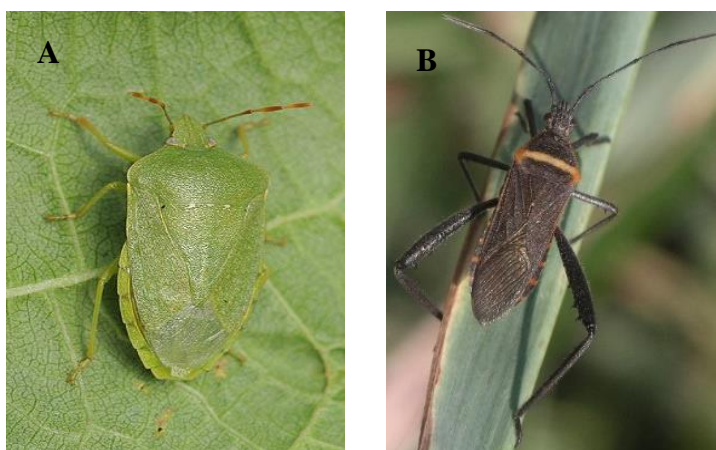


Figura 3. Fotos dos insetos fitófagos *Nezara viridula* (A) e *Phthia picta* (B).

Fonte: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/veg/bean/southern_green_stink_bug.htm;

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=994851#null

P. serpens possui as mesmas características celulares de outros organismos do gênero *Phytomonas*, porém ao contrário das outras espécies que são encontradas no látex e seiva de plantas, *P. serpens* se encontram nos frutos de tomateiros, sendo de fácil isolamento e cultivo, tornando-o um excelente modelo para estudo (COSTA, 2006). Embora *P. serpens* não seja considerado um microrganismo classicamente patogênico, um tomate maduro infectado por este tripanossomatídeo exibe manchas circulares e amareladas na superfície (Figura 4), além de apresentar queda na qualidade do seu conteúdo, possivelmente por ação do metabolismo energético dos parasitos (ELIAS, 2009). Tomates ainda verdes, folhas, flores e caule não são infectados, restringindo os danos aos frutos maduros (FIORINI et al., 1993).

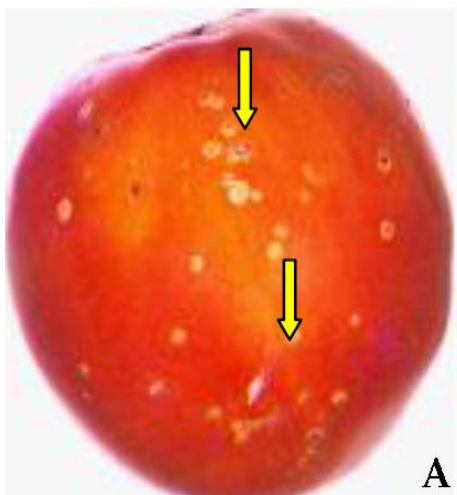


Figura 4. Tomate infectado por *Phytomonas serpens*.

Fonte: Adaptado de Elias (2009)

Outras características importantes encontradas nas *P. serpens* são as diversas funções mitocondriais que são encontradas em outros tripanossomatídeos, porém são ausentes no genoma do cinetoplasto do parasita, como respiração mediada por citocromo e ciclo de Krebs, sendo que a produção energética da célula é baseada na glicólise realizada nos glicossomos localizados no corpo celular desses organismos (COSTA, 2006; MASLOV et al., 2001).

Um estudo também importante, realizado com este parasita, foi a comprovação de uma reação antigênica cruzada entre *P. serpens* e *T. cruzi*, em experimentos com camundongos BALB/c, com soro de pacientes chagásicos e de coelhos, onde revelou alto grau de proteção em camundongos BALB/c, altamente suscetíveis, após imunização com *P. serpens* (BREGANÓ et al., 2003), demonstrando a semelhança entre os parasitas.

2.4. Óleos essenciais

Dentre os métodos de controle sobre os organismos fitopatogênicos, o uso de óleos essenciais (OEs) é um dos mais explorados. Os OEs são uma mistura complexa de compostos orgânicos, como ésteres, álcoois, cetonas, ácidos, terpenoides e fenóis, provenientes do metabolismo secundário de plantas (WEISS et al., 2009). Os OEs também podem ser chamados de óleos voláteis ou óleos estéreis devido às suas características físico-químicas como volatilidade, solubilidade em solventes orgânicos e aroma intenso, muitas vezes agradável (MATTOS et al., 2007).

Segundo Regnalt-Roger et al. (2012), os óleos essenciais são produzidos em mais de 17.000 espécies aromáticas de plantas superiores, pertencentes principalmente às Famílias Myrtaceae, Lauraceae, Lamiaceae e Asteraceae. A síntese e acumulação dos OEs estão associados à presença de estruturas secretoras complexas, como tricomas glandulares (Lamiaceae), cavidades secretoras (Myrtaceae, Rutaceae) e ductos de resina (Asteraceae, Apiaceae) (RODRIGUEZ et al., 1984). Dependendo da espécie da planta, os óleos são armazenados em diferentes órgãos, como exemplo, flores (bergamota, laranja, Citrus, bergamia), folhas (capim-limão, *Citronella* spp.; Eucalipto, *Eucalyptus* spp.), madeira (sândalo, *Santalum* spp.), raízes (capim vetiver, *Chrysopogon zizanioides*), rizomas (gengibre, *Zingiber officinale*; cúrcuma, *Curcuma longa*), frutos (anis, *Pimpinella anisum*) e sementes (noz-moscada, *Myristica fragrans*) (RÍOS, 2016).

Muitos estudos têm sido realizados sobre a atividade biológica dos óleos essenciais, tais como inseticida, bactericida, virucida, fungicida, antiparasitária, citotóxica, cosmética, medicinal e em aplicações alimentares (BASILE et al., 2006; GOMES et al., 2013; GONÇALVES et al., 2012; LIU et al., 2006; BAKKALI et al., 2008; KYARIMPA et al., 2014). Diversos óleos essenciais de famílias de plantas como Myrtaceae, Lamiaceae, Verbenaceae e

Zingiberaceae são abundantemente estudadas como meios de controle de microrganismos fitopatogênicos, como exemplo o uso de óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* no controle de fungos fitopatogênicos de solo como *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani*. Já foi demonstrada a inibição do crescimento e disseminação desses fungos por esse OE em plantas de tomate, pimenta e pimentão (AYINDE, 2016). O óleo essencial de cravo-da-índia possui grande capacidade inibidora sobre o fungo *Colletotrichum musae* e a bactéria *Raustonia solanacearum*, patógenos importantes em plantações de bananas (BARBOSA et al., 2015).

Outros óleos essenciais são estudados como controle alternativo de patógenos de plantas, podendo citar o uso dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* no controle *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de maracujá (AQUINO et al., 2012), *Cymbopogon nardus* e *Zingiber officinalis* no controle do moko-da-bananeira (AMORIM et al., 2011), *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e *Verbena officinalis* no controle de fungos de pós-colheita como *Phytophthora citrophthora*, *Rhizopus stolonifer* e *Penicillium italicum* (CAMELE et al., 2010), *Ocimum ciliatum* na inibição de *Xanthomonas citri* (MOGHADDAM et al., 2014), *Ocimum basilicum*, *Rosmarinus officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Origanum vulgare* no controle de *Pilidiella granati* em Romã (THOMIDIS; FILOTHEOU, 2016), dentre outros.

O uso dos óleos essenciais em pesquisas sobre ação inibitória de patógenos de plantas possui um amplo destaque na comunidade científica como demonstrado. Devido à diversidade na composição química que apresenta diversas moléculas tóxicas aos microrganismos, há uma grande variedade de OE que pode ser utilizada no controle alternativo de microrganismos fitopatogênicos.

2.5. Mecanismos de ação dos OEs

As propriedades antimicrobiana e os prováveis mecanismos de ação dos óleos essenciais são devido às substâncias químicas presentes nesses óleos (BAKKALI et al., 2008). Um dos modos de ação é a alteração da membrana citoplasmática, devido à hidrofobicidade dos óleos que causam mudanças estruturais em camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, tornando essas células permeáveis (TURINA et al., 2006).

Em um experimento sobre a atividade antiprotozoária do óleo essencial *Ocimum gratissimum* sobre *Leishmania amazonensis*, foi observado danos nas células protozoárias, causadas por alterações na membrana mitocondrial interna desses parasitas (UEDA-NAKAMURA et al., 2006). O aumento nos níveis de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e espécies reativas ao nitrogênio (RNS), devido às alterações intracelulares causadas pelos óleos essenciais, também podem comumente levar a morte celular dos protozoários, fato demonstrado quando células peritoneais de macrófagos de ratos infectadas com *L. amazonensis* foram tratadas com óleo essencial de *O. gratissimum*, no qual se observou um alto nível de RNS (UEDA-NAKAMURA et al., 2006). Também já foi observado o aumento de níveis de ROS em células de *L. donovani* quando tratadas com zerumbona, que é o composto majoritário do óleo essencial de *Zingiber zerumbet* (MUKHERJEE et al., 2016).

As células dos tripanossomatídeos possuem organelas normalmente ricas em lipídeos, sendo que um aumento anormal desses corpos lipídicos por ação de óleos essenciais, causam instabilidade na membrana plasmática e flagelar, desorganização do retículo plasmático e do complexo de Golgi (RODRIGUES et al., 2002, 2008; SILVA et al., 2018). O aumento de corpos lipídicos podem ser devido ao acúmulo de lipídios intermediários endógenos que foram produzidos devido à inibição da biossíntese de ergosterol, o que foi observado também em células de *L. amazonensis* quando tratadas com óleo essencial de *Ocimum canum*, que resultou em alterações na membrana do núcleo celular (SILVA et al., 2018). Também foi relatado o acúmulo de grandes corpos lipídicos no citoplasma de promastigotas de *L. amazonensis* quando tratadas com óleo essencial de *Lippia sidoides* (MEDEIROS et al., 2011).

Diversas alterações podem ocorrer nas células protozoárias devido à presença de moléculas presentes nos óleos essenciais, principalmente devido a sua característica hidrofóbica. Essa característica resulta não somente em um único possível mecanismo de ação sobre as células, mas sim a possibilidade de que ocorram várias ações, desordem e injúrias ao mesmo tempo.

2.6. *Varronia curassavica*

Varronia curassavica Jacq. - sinonímia *Cordia verbenacea* DC ou *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schults, pertencente à Família Boraginaceae, é uma espécie arbustiva com cerca de 0,5 a 4 m de altura, perene, com folhas simples, alternas, coriáceas, aromáticas, com 5-10 cm de comprimento (Figura 5). As inflorescências são terminais em espiga com flores branca, os frutos são cariopses esféricas, de coloração vermelha quando maduras (LORENZI e MATOS, 2008).

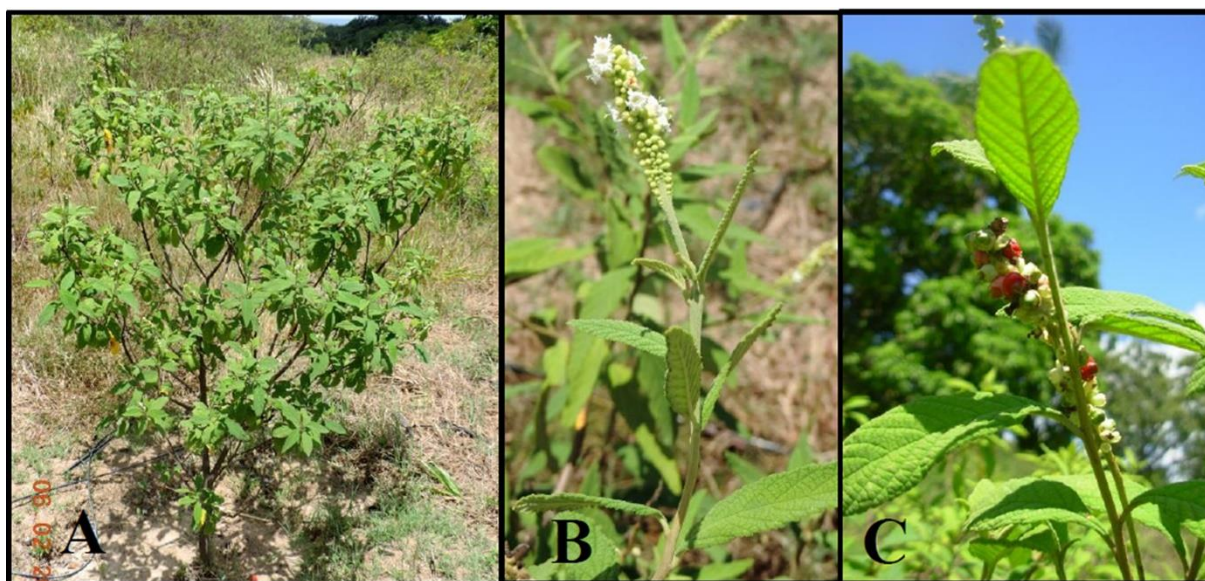


Figura 5. Planta de *Varronia curassavica* (A), inflorescência (B) e frutos (C).

Fonte: Nizio (2015)

Popularmente recebe vários nomes, dentre os quais podem se destacar: catinga-de-barão, erva-preta, erva-baleeira, maria-milagrosa, maria-rezadeira e salicinia (LORENZI e MATOS, 2008). As folhas aromáticas são utilizadas na medicina popular devido as suas propriedades anti-inflamatória, analgésica e cicatrizante. Suas propriedades medicinais são atribuídas ao óleo essencial presente nas folhas, devido à presença de mono e sesquiterpenos, dentre os quais destacam-se o α -pineno, α -humuleno, β -cariofileno e aloaromadendreno (CARVALHO et al., 2004; SANTOS et al., 2006; FEIJÓ et al., 2014).

Diversos autores já confirmaram as propriedades anti-inflamatórias e analgésicas da *V. curassavica* (SERTIÉ et al., 1991; FERNANDES et al., 2007; PIMENTEL et al., 2012; SERTIÉ et al., 2005), sendo que a atividade anti-inflamatória da espécie é atribuída principalmente à presença do composto α -humuleno (MEDEIROS et al., 2007). Também já foi demonstrado que o óleo essencial de *V. curassavica* possui ações anti-inflamatórias quando aplicadas sob via orais em roedores, esta ação foi atribuída à presença dos compostos α -humuleno e E-cariofileno (PASSOS et al., 2007).

Outra atividade biológica importante do óleo essencial de *V. curassavica* é sua ação antimicrobiana, podendo-se citar sua atividade em diferentes microrganismos, como por exemplo, inibição das bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, e de bactérias gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (MICHIELIN et al., 2009), atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (SANTOS et al., 2006) e o efeito fungistático sobre *Candida albicans* e *Candida krusei* (RODRIGUES et al., 2012).

Além disso, as plantas de *V. curassavica* têm demonstrado ação antiprotozoária em alguns parasitas, tais como em *L. amazonenses* e *L. chagasi* (BRAGA et al., 2007), já Nizio et al. (2018) ao avaliarem os OEs de quatro genótipos de *V. curassavica*, demonstraram a atividade antiprotozoária dos óleos em um protozoário de peixe, *Ichthyophthirius multifiliis*. Possivelmente os OEs de *V. curassavica* também possuam ação inibitória em outras espécies de protozoários patogênicos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, E. P. da R.; ANDRADE, F. W. R. DE; MORAES, E. M. DA S.; SILVA, J. C. DA; LIMA, R. da S.; LEMOS, E. E. P. DE. Atividade Antibacteriana de Óleos Essenciais e Extratos Vegetais Sobre o Desenvolvimento de *Ralstonia Solanacearum* em Mudanças de Bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. Especial, p. 392–398, 2011.
- ARAÚJO, J.C.A.de; PEREIRA, J.C.R.; GASPAROTTO, L. **Murcha-de-Phytopomonas do coqueiro no Amazonas**. Circular Técnica n. 17, Embrapa, Manaus, Amazonas, Brazil, 2003.
- AQUINO, C. F.; SALES, N. DE L. P.; SOARES, E. P. S.; MARTINS, E. R. Chemical characterization and action of essential oils in the management of anthracnose on passion fruits. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 4, p. 1059–1067, 2012.
- AYINDE, B. A. Eucalyptus (*Eucalyptus citriodora* Hook., Myrtaceae) Oils. In: PREEDY, V. R. **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. 1.ed. San Diego: Academic Press, 2016. cap.46, p.413–419.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BARBOSA, M. S.; VIEIRA, G. H. C.; TEIXEIRA, A. V. Atividade biológica in vitro de própolis e óleos essenciais sobre o fungo *Colletotrichum musae* isolado de bananeira (*Musa* spp.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 2, p. 254–261, 2015.
- BASILE, A.; SENATORE, F.; GARGANO, R.; SORBO, S.; PEZZO, M. DEL; LAVITOLA, A.; RITIENI, A.; BRUNO, M.; SPATUZZI, D.; RIGANO, D.; VUOTTO, M. L. Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 240–248, 2006.
- BATISTOTI, M.; CAVAZZANA JR., M.; SERRANO, M. G.; OGATTA, S. F.; BACCAN, G. C.; JANKEVICIUS, J. V.; TEIXEIRA, M. M.; JANKEVICIUS, S. I. Genetic variability of trypanosomatids isolated from phytophagous hemiptera defined by morphological, biochemical, and molecular taxonomic markers. **J Parasitol**, v. 87, n. 6, p. 1335–1341, 2001.
- BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; DE, M.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 396–402, 2007.
- BREGANÓ, J. W.; PICÃO, R. C.; GRAÇA, V. K.; MENOLLI, R. A.; JANKEVICIUS, S. I.; FILHO, P. P.; JANKEVICIUS, J. V. *Phytopomonas serpens*, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 257–264, 2003.
- CAMARGO, E. P. *Phytopomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. **Advances in parasitology**, v. 42, p. 29–112, 1999.
- CAMELE, I.; FEO, V. DE; ALTIERI, L.; MANCINI, E.; MARTINO, L. DE; LUIGI RANA, G. An Attempt of Postharvest Orange Fruit Rot Control Using Essential Oils from Mediterranean Plants. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 6, p. 1515–1523, 2010.
- CARVALHO, P. M. de; RODRIGUES, R. F. O.; SAWAYA, A. C. H. F.; MARQUES, M. O.

- M.; SHIMIZU, M. T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2–3, p. 297–301, 2004.
- CHAUMONT, F.; SCHANCK, A. N.; BLUM, J. J.; OPPERDOES, F. R. Aerobic and anaerobic glucose metabolism of *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 67, n. 2, p. 321–331, 1994.
- COSTA, P. M. de O. **Exploração do genoma de *Phytomonas serpens***. 2006. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, 2006.
- DOLLET, M. Plant diseases caused by flagellate protozoa (*Phytomonas*). **Annual review of phytopathology**, v. 22, n. 1, p. 115-132, 1984.
- ELIAS, C. G. R. **Expressão de moléculas similares à cruzipaina em *Phytomonas serpens***. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Rio de Janeiro-RJ, 2009
- FEIJÓ, E. V. R. S.; OLIVEIRA, R. A.; COSTA, L. C. B. Light affects *Varronia curassavica* essential oil yield by increasing trichomes frequency. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 24, p. 516-523, 2014.
- FERNANDES, E. S.; PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F. M. DA; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228–236, 2007.
- FIORINI, J. E.; FARIA, E.; SILVA, P. M.; BRAZIL, R. P.; ATTIAS, M.; ESTEVES, M. J. G.; ANGLUSTER, J. Axenic cultivation of pathogenic *Phytomonas* species isolated from tomato fruit and from its phytophagous insect vector, *Phthia picta* (Hemiptera: Coreidae). **Cytobios**, v.75, p. 163-170. 1993.
- GIBBS, A. J. *Leptomonas serpens* n. sp., parasitic in the digestive tract and salivary glands of *Nezara viridula* (Pentatomidae) and in the sap of *Solanum lycopersicum* (tomato) and other plants. **Parasitology**, v.47(3-4), p.297-303, 1957.
- GOMES, M. R. F.; SCHUH, R. S.; BEMVENUTI JACQUES, A. L.; DORNELES, G. G.; MONTANHA, J.; ROEHE, P. M.; BORDIGNON, S.; DALLEGRAVE, E.; LEAL, M. B.; LIMBERGER, R. P. Biological assessment (antiviral and antioxidant) and acute toxicity of essential oils from *Drimys angustifolia* and *D. brasiliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 284–290, 2013.
- GONÇALVES, M. J.; TAVARES, A. C.; CAVALEIRO, C.; CRUZ, M. T.; LOPES, M. C.; CANHOTO, J.; SALGUEIRO, L. Composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oils of *Seseli tortuosum* L. and *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* (Samp.) M. Laínz from Portugal. **Industrial Crops and Products**, v. 39, p. 204–209, 2012.
- JANKEVICIUS, J. V.; JANKEVICIUS, S. I.; CAMPANER, M.; CONCHON, I.; MAEDA, L. A.; TELXEIRA, M. M.; FREYMULLER, E.; CAMARGO, E. P., Life Cycle and Culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a Trypanosomatid Parasite of Tomatoes. **The Journal of Protozoology**, v.36. p. 265-271, 1989.

- JASKOWSKA, E.; BUTLER, C.; PRESTON, G.; KELLY, S. *Phytomonas*: trypanosomatids adapted to plant environments. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 1, p. e1004484, 2015.
- KITAJIMA, E. W.; VAINSTEIN, M. H.; SILVEIRA, J. S. M. Flagellate protozoon associated with poor development of the root system of cassava in the Espírito Santo State, Brazil. **Phytopathology**, v.76(6), p.638-642, 1986.
- KYARIMPA, C. M.; BÖHMDORFER, S.; WASSWA, J.; KIREMIRE, B. T.; NDIEGE, I. O.; KABASA, J. D. Essential oil and composition of *Tagetes minuta* from Uganda. Larvicidal activity on *Anopheles gambiae*. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 400–404, 1 dez. 2014.
- LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F. G. A newly revised classification of the protozoa. **The Journal of Protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37–58, 1980.
- LIU, C. H.; MISHRA, A. K.; TAN, R. X.; TANG, C.; YANG, H.; SHEN, Y. F. Repellent and insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 15, p. 1969–1973, 2006.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.
- MASLOV, D. A.; A PODLIPAEV, S.; LUKES, J. **Phylogeny of the Kinetoplastida: Taxonomic Problems and Insights into the Evolution of Parasitism**. [s.l: s.n.]. v. 96, p. 397-402, 2001.
- MATTOS, S. H.; INNECCO, R.; MARCO, C. A.; ARAÚJO, A. V. **Plantas medicinais e aromáticas cultivadas no Ceará: tecnologia de produção e óleos essenciais**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil (série BNB - ciência e tecnologia 2), p. 61-63. 2007.
- MCGHEE, R. B.; COSGROVE, W. B. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. **Microbiological Reviews**, v. 44, n. 1, p. 140–173, 1980.
- MEDEIROS, M. DAS G. F. DE; SILVA, A. C. DA; CITÓ, A. M. DAS G. L.; BORGES, A. R.; LIMA, S. G. DE; LOPES, J. A. D.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, v. 60, n. 3, p. 237–241, 2011.
- MEDEIROS, R.; PASSOS, G. F.; VITOR, C. E.; KOEPP, J.; MAZZUCO, T. L.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 5, p. 618–627, 2007.
- MELOS, J. L. R.; ECHEVARRIA, A. Trypanosomatids Metabolic Systems as Potential Chemotherapeutic Targets. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 4, p. 374–392, 2012.
- MICHIELIN, E. M. Z.; SALVADOR, A. A.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA, A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6615–6623,

2009.

MOGHADDAM, M.; ALYMANESH, M. R.; MEHDIZADEH, L.; MIRZAEI, H.; GHASEMI PIRBALOUTI, A. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Ocimum ciliatum*, as a new source of methyl chavicol, against ten phytopathogens. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 144–148, 2014.

MUKHERJEE, D.; SINGH, C. B.; DEY, S.; MANDAL, S.; GHOSH, J.; MALLICK, S.; HUSSAIN, A.; SWAPANA, N.; ROSS, S. A.; PAL, C. Induction of apoptosis by zerumbone isolated from *Zingiber zerumbet* (L.) Smith in protozoan parasite *Leishmania donovani* due to oxidative stress. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 48–55, 2016.

NIZIO, D. A. de C.; FUJIMOTO, R. Y.; MARIA, A. N.; CARNEIRO, P. C. F.; FRANÇA, C. C. S.; COSTA SOUSA, N. DA; ANDRADE BRITO, F. DE; SAMPAIO, T. S.; FÁTIMA ARRIGONI-BLANK, M. DE; BLANK, A. F. Essential oils of *Varronia curassavica* accessions have different activity against white spot disease in freshwater fish. **Parasitology Research**, v. 117, n. 1, p. 97–105, 2018.

PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; CUNHA, F. M. DA; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 323–333, 2007.

PIMENTEL, S. P.; BARRELLA, G. E.; CASARIN, R. C. V.; CIRANO, F. R.; CASATI, M. Z.; FOGLIO, M. A.; FIGUEIRA, G. M.; RIBEIRO, F. V. Protective effect of topical *Cordia verbenacea* in a rat periodontitis model: Immune-inflammatory, antibacterial and morphometric assays. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, 2012.

PODLIPAEV, S. A. *Phytomonas elmanssiani* (Mastigophora: Trypanosomadina) from the plant *Cynanchum sibiricum* (Asclepiadaceae) in Central Asia and Kazakhstan. **Proc. Zool. Inst. Acad. Sci., USSR**, v. 144, p. 61–65, 1986.

PODLIPAEV, S. A. Insect Trypanosomatids: The Need to Know More. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 517–522, 2000.

REGNALT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J.T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 405–424, 2012.

RÍOS, J.-L. Essential Oils: What they are and how the terms are used and defined. In: PREEDY, V. R. **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. 1.ed. San Diego: Academic Press, 2016. Cap.1, p. 3–10.

RODRIGUES, F. G.; RODRIGUES, F. G.; ALMEIDA, S. X.; CAMPOS, A.; OLIVEIRA, L. S.; SARAIVA, M.; CABRAL, M. S.; COSTA, J. G. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy Research**, v. 4, n. 3, p. 161, 2012.

RODRIGUES, J. C. F.; ATTÍAS, M.; RODRIGUEZ, C.; URBINA, J. A.; SOUZA, W. DE. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 487–499, 2002.

RODRIGUES, J. C. F.; CONCEPCION, J. L.; RODRIGUES, C.; CALDERA, A.; URBINA, J. A.; SOUZA, W. DE. In vitro activities of ER-119884 and E5700, two potent squalene synthase inhibitors, against *Leishmania amazonensis*: Antiproliferative, biochemical, and ultrastructural effects. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 4098–4114, 2008.

RODRIGUEZ, E.; HEALEY, P. L.; MEHLA, I. **Biology and Chemistry of Plant Trichomes**. New York: Plenum. 1984.

SANTOS, A. L. S.; D'AVILA-LEVY, C. M.; ELIAS, C. G. R.; VERMELHO, A. B.; BRANQUINHA, M. H. *Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 8, p. 915–921, 2007.

SANTOS, R. P.; NUNES, E. P.; NASCIMENTO, R. F.; SANTIAGO, G. M. P.; MENEZES, G. H. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 5, p. 1027–1030, out. 2006.

SERTIÉ, J. A. A.; BASILE, A. C.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T. T.; AZZOLINI, C. P.; PENNA, S. C. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* III: Oral and topical antiinflammatory activity and gastrotoxicity of a crude leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 31, n. 2, p. 239–247, 1 fev. 1991.

SERTIÉ, J. A. A.; WOISKY, R. G.; WIEZEL, G.; RODRIGUES, M. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: Oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 338–344, 2005.

SILVA, V. D. DA; ALMEIDA-SOUZA, F.; TELES, A. M.; NETO, P. A.; MONDEGO-OLIVEIRA, R.; MENDES FILHO, N. E.; TANIWAKI, N. N.; ABREU-SILVA, A. L.; CALABRESE, K. DA S.; MOUCHREK FILHO, V. E. Chemical composition of *Ocimum canum* Sims. essential oil and the antimicrobial, antiprotozoal and ultrastructural alterations it induces in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Industrial Crops and Products**, v. 119, n. April, p. 201–208, 2018.

SVOBODOVÁ, M.; ZÍDKOVA, L.; ČEPIČKA, I.; OBORNÍK, M.; LUKEŠ, J.; VOTÝPKA, J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Typanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 423–432, 2007.

THOMIDIS, T.; FILOTHEOU, A. Evaluation of five essential oils as bio-fungicides on the control of *Pilidiella granati* rot in pomegranate. **Crop Protection**, v. 89, p. 66–71, 2016.

TURINA, A. DEL V; NOLAN, M. V.; ZYGADLO, J. A.; PERILLO, M. A. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, n. 2, p. 101–113, 2006.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; KOREHISA MAZA, P.; PRADO DIAS FILHO, B.; APARÍCIO GARCIA CORTEZ, D.; ALVIANO, D. S.; ROSA, M. DO S. S.; LOPES, A. H. C. S.; ALVIANO, C. S.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, n. 2, p. 99–105, 2006.

VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **International journal for parasitology**, v. 24, n. 8, p. 1317-1331, 1994.

WEISS, J.; GAYSINKSY, S.; DAVIDSON, M.; MCCLEMENTS, J. Nanostructure of encapsulation systems: food antimicrobials. In: BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; MORTIMER, A.; LINEBACK, D.; SPIESS, W.; BUCKLE, K.(eds.). **IUFOST world congress book: Global issues in food science and technology** (p. 425-479). Amsterdam: Elsevier INC, 2009.

YAMADA-OGATTA, S. F.; NAKAZATO, G.; FURLANETO, M. C.; NOGUEIRA, M. A. **Tópicos especiais em microbiologia**. Londrina: UEL / Departamento de Microbiologia, 2015.

4. ARTIGO 1

ÓLEO ESSENCIAL DE *Varronia curassavica* (CORDIACEAE) COMO POTENCIAL AGENTE DE BIOCONTROLE SOBRE *Phytomonas serpens*

Periódico a ser submetido: **Industrial crops and Products**

RESUMO

Os protozoários do gênero *Phytomonas* são responsáveis por diversas doenças em culturas agrícolas de grande importância econômica, no entanto ainda não existe nenhum tipo de controle registrado para esses fitopatógenos. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiprotozoária do óleo essencial (OE) de sete genótipos de *Varronia curassavica* e seus efeitos morfofisiológicos sobre as formas promastigotas de *Phytomonas serpens*. A análise química dos óleos essenciais por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa CG-MS dos genótipos VC-002, VC-104, VC-202, VC-302, VC-303, VC-601 e VC-701, demonstrou que α -pineno (56,69%), 7-ciclodecen-1-ona,7-metil-3-metileno-10-(1-propil) (48,63%), Germacreno D-4-ol (32,16%), ar-curcumeno (20,37%),7-ciclodecen-1-ona,7-metil-3-metileno-10-(1-propil) (19,32%), trans-cariofileno (21,78%) e ar-turmerona (28,36%) são os compostos majoritários para cada genótipo, respectivamente. Todos os OEs demonstraram atividade antiprotozoária, sendo o genótipo VC-202 o que apresentou a menor IC₅₀ (14 μ g/mL), além de possuir ação permanente sobre *P. serpens*. As imagens obtidas em microscopia de fluorescência e os dados de fluorescência obtidos utilizando o Iodeto de Propídio (PI) por espectrofotometria, demonstraram que houve alterações celulares com permeabilização na membrana citoplasmática. Através da citometria de fluxo, foi demonstrado que ocorreu perda no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) das células tratadas. Os óleos essenciais de *V. curassavica* possuem grande variabilidade química e demonstraram atividade antiprotozoária sobre *P. serpens*. Até o presente momento não há relatos da atividade de OEs sobre fitomonas, sendo assim o óleo essencial do genótipo 202 é uma potencial fonte de matéria bruta para formulação de bioprodutos para o controle de fitomonas.

Palavras-chave: Erva-baleeira, plantas medicinais, tripanossomatídeo, fitomonas, *Solanum lycopersicum*.

ABSTRACT

Using of *Varronia curassavica* (Cordiaceae) essential oil in the biocontrol of *Phytomonas serpens*.

The protozoa of the genus *Phytomonas* cause diseases in crops of agricultural and economic importance, however, there is still no control registered for these phytopathogens. The objective of this research was to evaluate the antiprotozoal activity of essential oil (EO) from seven *Varronia curassavica* genotypes and its morphophysiological effects on *Phytomonas serpens* promastigotes forms. The chemical analysis of the essential oils by gas chromatography with mass spectrometer GC-MS of the genotypes VC-002, VC-104, VC-202, VC-302, VC-303, VC-601 and VC-701, demonstrated that α -Pinene (56,69%), 7-Cyclodecen-1-ona.7-methyl-3-methylene-10-(1-propyl) (48,63%), Germacrene D-4-ol (32,16%), ar-Curcumene (20,37%), 7-Cyclodecen-1-ona.7-methyl-3-methylene-10-(1-propyl) (19,32%), E-Caryophyllene (21,78%) e ar-Turmerone (28,36%) are the major compounds for each genotype, respectively. All the EO demonstrated antiprotozoal activity and the genotype VC-202 presented the lower IC₅₀ (14 μ g/mL), presenting permanent effect against *P. serpens*. The images obtained in fluorescence microscopy and the data from fluorescence spectrophotometry using Propidium Iodide (PI), demonstrated cell alterations with permeabilization in cytoplasmic membrane. Through flow cytometry, it was demonstrated loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$ m) in EO treated cells. The EO of different *V. curassavica* genotypes presented wide chemical variability and demonstrated antiprotozoal activity against *P. serpens*. Until the present moment, there are not reports about EOs activity against *Phytomonas*, therefore, the EO of genotype 202 is a potential source of raw material for formulations of bioproducts for *Phytomonas* control.

Key-words: Erva-baleeira, medicinal plants, trypanosomatid, *Phytomonas*, *Solanum lycopersicum*.

HighLights

- Óleos essenciais de *Varronia curassavica* (OEVC) possuem atividade inibitória sobre *Phytomonas serpens*;
- A menor IC₅₀ foi do OEVC, genótipo 202 (14 μ g/mL);
- IC₅₀ e 2xIC₅₀ (OEVC-202) causaram permeabilização na membrana plasmática em *P. serpens*;
- Ocorreu perda no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$ m) em *P. serpens* tratadas com IC₅₀ e 2xIC₅₀ (OEVC-202).

4.1. Introdução

Os protozoários do gênero *Phytomonas*, pertencentes à Família Trypanosomatidae, são causadores de diversas doenças em plantas tropicais de importância econômica, tais como, coqueiro (*Cocos nucifera*), dendezeiro (*Elaeis guineenses*), cafeeiro (*Coffea* sp), mandioca (*Manihot esculenta*), entre outras (Jaskowska et al., 2015). No estado do Amazonas - Brasil, em 2001, foi constatada a presença de diversas plantas de coqueiro infectadas com *Phytomonas staheli*, atingindo cerca de 47% das plantações de sete municípios (Araújo et al., 2003). No Espírito Santo – Brasil, foi confirmado o protozoário *Phytomonas françai* como causador da doença “chochamento das raízes” em plantas de mandioca, chegando a atingir 50% das plantas causando enormes perdas na produção (Kitajima et al., 1986). Vale ressaltar que nenhuma das

doenças de plantas causadas por esses protozoários possuem algum controle químico registrado.

A espécie *Phytomonas serpens* foi isolada em frutos de tomates e descrita como uma espécie de alto polimorfismo exclusivo de tomate. Inicialmente recebeu o nome *Leptomonas serpens* e posteriormente foi reclassificada como *Phytomonas serpens* (Gibbs 1957; Jankevicius et al., 1989; Batistoti et al., 2001). Ainda que o *P. serpens* não seja considerado um parasita fitopatogênico, existem relatos de danos causados em frutos de tomateiro por esse microrganismo, como a perda da viabilidade de frutos maduros com alteração na coloração, passando de uma cor avermelhada para uma cor dourada (Camargo, 1999). A *P. serpens* também pode produzir auxinas, que interferem na produção hormonal da planta (Ienne et al., 2014; Jaskowska et al., 2015). Além disso, devido às diversas características e facilidade para isolamento e manutenção desse protozoário em meio de cultura, o *P. serpens* é considerado um ótimo modelo para estudos biológicos do gênero *Phytomonas* (Camargo, 1999).

Não há produtos registrados para o controle de *Phytomonas*, sendo necessária a pesquisa de métodos de controle para esse patógeno. Dentre os métodos de controle, o uso de óleos essenciais (OEs) são um dos mais explorados. O OE é um produto natural que contém uma mistura complexa de compostos orgânicos, como ésteres, álcoois, cetonas, ácidos, terpenoides e fenóis, provenientes do metabolismo secundário de plantas (Weiss et al., 2009). Muitos estudos têm sido realizados sobre a atividade biológica dos óleos essenciais (OEs), tais como inseticida, bactericida, virucida, fungicida, antiparasitária, citotóxica, cosmética, medicinal e em aplicações alimentares (Bakkali et al., 2008; Basile et al., 2006; Gomes et al., 2013; Gonçalves et al., 2012; Kyarimpa et al., 2014; Liu et al., 2006).

Os OEs têm sido muito utilizados na medicina tradicional e em pesquisas para estudos de novas atividades biológicas, tais como atividade leishmanicida (Silva et al., 2018), como é o caso do OE de *Varronia curassavica*. A *V. curassavica* Jacq, sinonímia *Cordia verbenacea* DC ou *Cordia curassavica* (Jacq.), comumente conhecida como erva-baleeira (Roem. & Schults), pertencente à Família Boraginaceae, é utilizada na medicina popular devido às suas propriedades anti-inflamatória, analgésica e cicatrizante (Lorenzi e Matos, 2008). Suas propriedades estão atribuídas à presença de substâncias como α -pineno, α -humuleno, β -cariofileno e aloaromadendreno (Carvalho et al., 2004; Feijó et al., 2014; Santos et al., 2006) presentes em seu óleo essencial.

Outra atividade importante relatada em pesquisas com o óleo essencial de *V. curassavica* (OEVC) é sua ação antimicrobiana que já foi relatada em vários estudos, tais como: inibição de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) e bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) (Michielin et al., 2009); efeito fungistático sobre *Candida albicans* e *Candida krusei* (Rodrigues et al., 2012); atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (Santos et al., 2006); controle de formigas *Dorymyrmex thoracicus* (Oliveira et al., 2019); ação leishmanicida em *Leishmania amazonenses* e *Leishmania chagasi* (Braga et al., 2007) e atividade antiprotozoária em *Ichthyophthirius multifiliis* (Nizio et al., 2018).

Assim, o uso dos OEs com ação inibitória sobre protozoários fitopatogênicos, como as fitomonas, tem um papel importante para a criação de produtos naturais, com uso no controle de doenças de plantas. Deste modo, neste trabalho foi avaliada a composição química dos OEs de genótipos de *V. curassavica*, sua atividade antiprotozoária sobre *P. serpens* e análise dos efeitos morfofisiológicos do óleo essencial sobre as fitomonas.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Material vegetal

As plantas foram coletadas no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *V. curassavica* que está implantado no Horto de Plantas Medicinais da Fazenda Experimental "Campus Rural da UFS", localizada no município de São Cristóvão-SE, latitude 11° 00' S e longitude 37° 12' O. Foram utilizados 7 genótipos do BAG da Universidade Federal de Sergipe: VC-002, VC-

202, VC-104, VC-302, VC-303, VC-601 e VC-701. Os genótipos escolhidos são os principais representantes dos grupos químicos que compõem o BAG de *V. curassavica*.

O acesso ao patrimônio genético foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com número A8CCB3B.

4.2.2. Extração dos óleos essenciais

As folhas das plantas foram coletadas em desfolha manual e acondicionadas em estufa de circulação de ar forçado a 40°C durante cinco dias para secagem. A extração do OE foi realizada através do método de hidrodestilação com aparelho Clevenger, acoplado a um balão de fundo redondo de 3000 mL. Foram utilizados 75g de folhas secas por balão, para dois litros de água destilada durante 2h (Ehlert et al., 2006). Após extração, os OEs foram estocados em frascos âmbar e armazenados em freezer (-20°C).

4.2.3. Análise química do óleo essencial

A análise da composição química dos OEs foi realizada utilizando um Cromatógrafo Gasoso acoplado à Espectrômetro de Massas, acoplado por Detector Iônico de Chamas (CG-EM) por meio do equipamento GCMSQP2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com injeção automática AOC-20i (Shimadzu). As separações foram realizadas em uma coluna capilar de sílica fundida Rtx®-5MS Restek (5%-difenil-95%-dimetilpolisiloxano) 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de filme, em um fluxo constante de Hélio 5.0 com taxa de 1,0 mL min⁻¹. A temperatura de injeção foi de 280 °C, 1,0 µL (10 mg mL⁻¹), com uma razão de split de 1:30. A programação de temperatura do forno iniciou a partir de 50 °C (isoterma durante 1,5 min), com um aumento de 4 °C min⁻¹, até 200 °C, em seguida, a 10 °C min⁻¹ até 300 °C, permanecendo por 5 min.

Para o CG/EM as moléculas foram ionizadas por elétrons com energia de 70 eV. Os fragmentos analisados por um sistema quadrupolar programado para filtrar fragmentos/íons com m/z na ordem de 40 a 500 Da e detectados por um multiplicador de elétrons. O processamento de dados foi realizado com auxílio do software CGMS Postrun Analysis (Labsolutions- Shimadzu).

A identificação dos componentes dos OEs foi realizada com base na comparação dos índices de retenção e espectro de massas existentes na literatura (Adams, 2007). Para o índice de retenção foi utilizada a equação de Van den Dool e Kratz (1963) em relação a uma série homóloga de n-alcenos (nC9-nC31). Para os espectros de massas foram utilizadas três bibliotecas do equipamento WILEY8, NIST107 e NIST21 que permitem a comparação dos dados dos espectros com aqueles constantes das bibliotecas utilizando um índice de similaridade de 80%.

4.2.4. Manutenção e cultivo de promastigotas de *Phytomonas serpens*

O isolado de *P. serpens* (Estirpe 9T) foi obtido da coleção de tripanossomatídeos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) – Rio de Janeiro, Brasil. As formas promastigotas de *P. serpens* foram mantidas em meio de cultura Schneider^(R) suplementado com soro fetal bovino (S.F.B) a 10% e 1% de penicilina streptomomicina e foram incubados em uma incubadora B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) a 26°C. Os protozoários em fase exponencial, foram utilizados para os experimentos de análise da atividade antiprotozoária do óleo essencial.

4.2.5. Atividade dos óleos essenciais de *Varronia curassavica* em promastigotas de *Phytomonas serpens*

As formas promastigotas de *P. serpens* (5x10⁵ células/mL) de uma cultura em fase log de crescimento (72 hrs) foram adicionadas a uma placa de 96 poços com diferentes concentrações (125-3,9µg/mL) dos OEs dos sete genótipos *V. curassavica*. Poços contendo ou não uma droga de referência (Anfotericina B 10 - 0,15 µg/mL), foram usados como controles.

A placa foi incubada em estufa B.O.D. a 26°C e a viabilidade dos parasitas foi avaliada após 48h usando o método fluorimétrico da resazurina. Após a incubação, foram adicionados 50µL de uma solução de Resazurina (200µM) em cada poço, e as placas foram incubadas no escuro por 45 minutos. A leitura da fluorescência emitida foi realizada em um espectrofotômetro leitor de microplacas (Synergy™ H1, *BioTekHybrid Technology*) no comprimento de onda de 550/590nm (excitação/emissão). Os dados foram transformados e normalizados e os resultados utilizados no cálculo da IC₅₀ (concentração que inibiu 50% das células). Os OEs foram solubilizados com o solvente DMSO (Dimetilsulfóxido) em concentrações abaixo de 0,1%, não afetando as células de *P. serpens* nos experimentos (dados não demonstrados). O OE que apresentou menor IC₅₀ foi utilizado nos experimentos subsequentes.

4.2.6. Curva de crescimento de promastigotas de *Phytomonas serpens* na presença de diferentes concentrações do OEVC-202

As fitomonas (1x10⁵ células/mL) foram tratadas ou não com a IC₅₀, 2xIC₅₀, 4xIC₅₀ do OEVC-202 e cultivadas em placa com 12 poços. A placa foi incubada em uma B.O.D. a 26°C, sendo o crescimento de células da cultura avaliado por contagem diária através da câmara de Neubauer, durante cinco dias, com auxílio de um microscópio óptico invertido na lente objetiva 10x. Na mesma placa, foram retiradas amostras de células tratadas ao entrarem em fase exponencial de crescimento, lavadas cinco vezes com tampão fosfato salino (PBS) e re-inoculadas (1x10⁵ células/mL) em uma nova placa de 12 poços contendo meio de cultura livres de OEVC-202, com o crescimento celular analisado por contagem diária através da câmara de Neubauer.

4.2.7. Análise dos níveis de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em promastigotas de *Phytomonas serpens*

Os níveis intracelulares de ROS (espécies reativas de oxigênio), subproduto do metabolismo natural do oxigênio em células em condições de estresse, foram mensurados em promastigotas de *P. serpens* (5x10⁶ células/mL) tratadas ou não com IC₅₀, 2xIC₅₀ e 4xIC₅₀ do OEVC-202. As células foram incubadas durante uma hora em placa de 12 poços. Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em 200µL de PBS, com a suspensão de células transferidas para uma placa de 96 poços, e incubadas com 20µM de H2DCFDA (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato) durante 30 minutos. Ao mesmo tempo, como controle positivo, as células não tratadas foram lavadas com PBS duas vezes, e tratadas com 750µM de H₂O₂, sendo incubadas na estufa durante 30 minutos, após esse tempo, as células foram ressuspensas em 200µL de PBS em placa de 96 poços, e incubadas com 20µM de H2DCFDA durante 30 minutos. A fluorescência produzida foi lida em um espectrofotômetro leitor de microplaca (Synergy™ H1, *BioTekHybrid Technology*), no comprimento de onda de 492/527nm (excitação/emissão).

4.2.8. Análise da integridade da membrana plasmática de promastigotas de *Phytomonas serpens*

4.2.8.1. Espectrofotometria de fluorescência

Para avaliar a integridade da membrana plasmática dos parasitas, foi utilizado o Iodeto de Propídeo (PI), sonda fluorescente que marca o DNA das células quando ocorre perda da integridade da membrana celular. As promastigotas das fitomonas (5x10⁵ células/mL) foram cultivadas em placa com 12 poços, tratadas ou não com a IC₅₀ e 2xIC₅₀ do OEVC-202. Como controle positivo, as células foram aquecidas em banho-maria a 80°C durante 10 minutos. A placa foi incubada durante 48 horas em uma B.O.D. a 26°C. Após esse período, foram lavadas duas vezes com PBS e depois coradas com 2µL de PI (100µg/mL) e incubadas no escuro por 10 minutos. A fluorescência produzida foi lida em um espectrofotômetro leitor de microplaca

(Synergy™ H1, BioTekHybrid Technology), no comprimento de onda de 535/527nm (excitação/emissão).

4.2.8.2. Microscopia de fluorescência

As promastigotas das fitomonas (5×10^5 células/mL) foram tratadas com IC_{50} e $2 \times IC_{50}$ do OEVC-202, e incubadas em placa de 12 poços por 48 horas, o controle negativo foi feito com o meio de cultura contendo somente fitomonas. Após o tempo de incubação de 48 horas, foram feitas duas lavagens em PBS e as células foram ressuspensas em 100 μ L do tampão. Ao mesmo tempo, foram tratadas células em banho-maria a 80°C durante 10 minutos como o controle positivo. Com isso, adicionou 5 μ L do fluorocromo Iodeto de Propídio (PI) com concentração de 100 μ g/mL, após tempo de incubação de 10 minutos no escuro, foi adicionado 10 μ L do corante DAPI (100 μ g/mL), sendo incubado novamente no escuro durante 15 minutos. Assim, foi analisada a integridade morfológica dos protozoários, através do microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Imager 2).

4.2.9. Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de promastigotas de *Phytomonas serpens*

Para avaliar o efeito do OEVC-202 sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), foi utilizada a Rodamina 123 (Rh123), uma sonda fluorescente específica para mitocôndrias em células vivas (Garner et al., 1997), que emite menor fluorescência quando o potencial de membrana mitocondrial é alterado. As promastigotas (1×10^6 células/mL) foram tratadas com IC_{50} , $2 \times IC_{50}$ e $4 \times IC_{50}$ do OEVC-202 e incubadas durante 24 horas. Como controle positivo, foi incubado células com CCCP (Carbonil cianeto 4-clorofenilhidrazona – 50 μ M) durante 15 minutos no escuro. As células foram lavadas duas vezes com PBS, e coradas com 10 μ g/mL de Rh123, durante 15 minutos no escuro, realizando a análise por citometria de fluxo através do Citômetro Attune® Acoustic Focusing (Life Technologies). Um total de 10.000 eventos foram adquiridos e analisados pelo programa Attune® Cytometer Software.

Mudanças na emissão da fluorescência foram quantificados através do índice de variação (IV) dado pela equação $IV = [(MT - MC) / MC]$, onde MT é a mediana de fluorescência emitida pela Rodamina nos protozoários tratados, e MC é a mediana da fluorescência do controle. Quando IV for negativo, demonstra que houve despolarização da membrana das mitocôndrias.

4.2.10. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata em três dias independentes. A IC_{50} foi obtida por regressão sigmoidal e os valores expressos em média \pm erro padrão. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando two-way ANOVA e teste de Tukey. As análises dos dados foram efetuadas através do programa GraphPad Prism 7.01. As diferenças foram consideradas significantes quando: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Análise química do óleo essencial de *Varronia curassavica*

Os compostos presentes nos OEs foram ordenados conforme o índice de retenção e quantificados pela porcentagem de área relativa. Foram identificados e analisados cerca de 84 compostos nos OEVC, genótipos VC-002, VC-104, VC-202, VC-302, VC-303, VC-601 e VC-701. Os compostos majoritários foram: α -pineno (56,69%), 7-ciclododecen-1-ona,7-metil-3-metileno-10-(1-propil) (48,63%), Germacreno D-4-ol (32,16%), ar-curcumeno (20,37%), 7-ciclododecen-1-ona,7-metil-3-metileno-10-(1-propil) (19,32%), E-cariofileno (21,78%) e ar-turmerona (28,36%), para cada genótipo, respectivamente (Tabela 1).

A composição química dos OEs avaliados é composta, em maioria, por sesquiterpenos, com exceção do genótipo VC-002, que possui cerca de 60,09% de monoterpenos. Além desse,

o genótipo VC-601 possui cerca de um terço de monoterpenos, uma grande parcela se comparado a outros genótipos. Os OEs de todos os genótipos analisados possuem E-cariofileno (1,46-21,78%) e α -humuleno (0,61-4,98%). O α -humuleno é considerado um marcador químico do OEVC (Gilbert e Favoreto, 2012). Esses compostos são importantes na ação anti-inflamatória cuja atividade fitoterápica já foi confirmada por diversos autores (Medeiros et al., 2007; Passos et al., 2007; Pimentel et al., 2012; Sertié et al., 2005).

Os OEs dos sete genótipos de *V. curassavica* provenientes do BAG do "Campus Rural da UFS", localizado no município de São Cristóvão-SE, possuem uma alta variabilidade em sua constituição química. Em alguns casos essa variabilidade em um OE é devido às condições climáticas, do solo, idade da planta, estação do ano e diversos outros fatores (Silva et al., 2018). Porém, nesse estudo as plantas são provenientes de um BAG e pouco se diferenciam quanto aos fatores abióticos, tais como, temperatura, precipitação e incidência solar, sendo os fatores genéticos e a interação genótipo versus ambiente responsáveis pela diversificação da constituição química dos OEs dos genótipos de *V. curassavica* (Nizio et al., 2015).

4.3.2. Atividade dos óleos essenciais de *Varronia curassavica* sobre a viabilidade de promastigotas de *Phytomonas serpens* – In vitro

O ensaio de atividade antiprotozoária dos sete genótipos do OEVC em promastigotas de *P. serpens*, demonstrou que todos os genótipos apresentaram atividade inibitória sobre *P. serpens*. As IC₅₀ variaram entre 13,94 a 42,77 µg/mL, sendo que o genótipo VC-202 foi o que apresentou a menor IC₅₀ (Tabela 2). O valor da IC₅₀ para a Anfotericina B foi de 1,06 µg/mL. Diversos autores já relataram atividade antiprotozoária dos OEs em parasitos da Família Trypanosomatidae, tais como *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonenses*, *Leishmania chagasi* e *Trypanosoma cruzi* (Azeredo et al., 2014; Ceole et al., 2017; Silva et al., 2018; Ueda-Nakamura et al., 2006; Oliveira et al., 2013).

A ação leishmanicida em *L. amazonensis* e *L. chagasi* (Andrade et al., 2016; Braga et al., 2007) e atividade antiprotozoária em *I. multifiliis* (Nizio et al., 2018) do OEVC também já foi relatada. Além disto, Nizio et al. (2018), ao avaliarem atividade do OE em quatro genótipos do mesmo BAG de *V. curassavica* sobre o parasita de peixes *Ichthyophthirius multifiliis*, também observaram a melhor atividade do genótipo VCUR-202 sobre esse protozoário. Vale destacar que nenhuma atividade de óleos essenciais sobre as fitomonas foi relatada até a presente data, devido a isso, os resultados demonstrados aqui possuem grande importância para formulação de bioprodutos no controle de protozoários fitopatogênicos.

O efeito de diferentes concentrações do OEVC-202 (devido a sua baixa IC₅₀ e sua ação antiprotozoária já estudada) sobre o crescimento das promastigotas de *P. serpens* foi avaliada até 96 horas. Foi observada uma redução na proliferação das células de fitomonas em aproximadamente 62,2%, 59,3% e 81,3% quando foram tratadas com IC₅₀ (14 µg/mL), 2xIC₅₀ (28 µg/mL) e 4xIC₅₀ (56 µg/mL) do OEVC, respectivamente (Figura 1). O OEVC-202 demonstrou efeito permanente sobre o crescimento das células de fitomonas, uma vez que quando as células foram recultivadas em meio de cultura livre do OE, ainda foi observada uma redução de cerca de 50%, 66,2% e 75% na proliferação celular para as células anteriormente tratadas com a IC₅₀, 2xIC₅₀ e 4xIC₅₀ do OEVC, respectivamente, quando comparados com o controle após 72 horas sem exposição ao OE (Figura 2).

4.3.3. Análise dos níveis de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em promastigotas de *Phytomonas serpens*

Análise dos níveis intracelulares de ROS das fitomonas tratadas com IC₅₀, 2xIC₅₀ e 4xIC₅₀ do OEVC-202, demonstra que não houve estresse oxidativo nas células, não se diferenciando estatisticamente do controle. O tratamento com H₂O₂, que foi utilizado como controle positivo, causou oxidação intracelular nas promastigotas de fitomonas e emitiu fluorescência quando as células tratadas foram excitadas (Figura 3). Provavelmente o OEVC possui propriedades antioxidantes, como já foi relatado para outros óleos essenciais como de

Cymbopogon flexuosus, *Shinus terebinthifolius*, *Eugenia caryophyllata* (Costa et al., 2018; Dannenberg et al., 2016; Silvestri et al., 2010).

O extrato etanólico de *V. curassavica* também protegeu o estômago de camundongos contra lesões induzidas por etanol, atribuindo esse efeito protetor à ação antioxidante do extrato (Roldão et al., 2008). Dessa forma, a produção de ROS não deve ser considerada como possível mecanismo de ação do OEVC na inibição do crescimento da *P. Serpens*.

4.3.4. Avaliação da integridade da membrana celular de promastigotas de *Phytomonas serpens*

O iodeto de propídio (PI) é um marcador de DNA fluorescente amplamente utilizado para diferenciar células vivas/mortas, pois somente penetra na célula que possua injúrias na membrana celular. As promastigotas tratadas com a IC₅₀ e 2xIC₅₀ do OEVC-202 apresentaram maior fluorescência devido ao acúmulo de PI quando comparado com células vivas (Figura 4). Esse efeito é consistente com danos na membrana celular das fitomonas causadas pelos OEs. Devido às características hidrofóbicas dos óleos essenciais, eles podem penetrar a membrana plasmática causando oxidação de lipídios (Bakkali et al., 2008; Ceole et al., 2017; Machado et al., 2014), possibilitando a entrada do PI, evidenciando a morte celular causada pelo OE.

Oliveira et al. (2009), observaram também mudanças na permeabilidade da membrana pelo aumento da fluorescência do PI em promastigotas de *L. chagasi*, quando tratadas com óleo essencial *Cymbopogon citratus*. Em nosso estudo, o tratamento com a IC₅₀ do OEVC apresentou maior média de fluorescência se comparado ao tratamento com 2xIC₅₀. Possivelmente a maior concentração do OEVC resultou em maior quantidade de células totalmente degradadas, impossibilitando o acúmulo de PI dentro das células.

As imagens de microscopia de fluorescência revelam perda da integridade da membrana citoplasmática do parasita, permitindo a entrada do PI que se liga ao DNA do protozoário, emitindo fluorescência quando excitada, nos tratamentos com a IC₅₀ e 2xIC₅₀ (Figura 5). O controle positivo com banho-maria também causou alterações na membrana das promastigotas de *P. serpens*. Os efeitos na integridade da membrana observados aqui já foram relatados no uso de outros produtos naturais sobre tripanossomatídeos (Ceole et al., 2017; Medina et al., 2015; Santoro et al., 2007).

Os óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris*, quando utilizados em tratamentos de células epimastigotas de *T. cruzi*, causaram alterações na membrana plasmática com arredondamento das células (Santoro et al., 2007). A tomatina, um glicoalcaloide presente em plantas de tomate, quando utilizada para o controle de *P. serpens*, causou a morte das promastigotas também por permeabilização da membrana plasmática (Medina et al., 2015). Assim, pelo menos um dos mecanismos da morte celular causada pelo OEVC, é a permeabilização da membrana celular do parasita, como já observado em trabalhos anteriores.

4.3.5. Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Utilizando a citometria de fluxo, ao energizar as células tratadas, é possível obter resultado do acúmulo de Rh123 nas mitocôndrias e a diferença no $\Delta\psi_m$ entre as células tratadas e não tratadas. Imagens representativas da população de células de *P. serpens* (FSC – Tamanho x SSC – Granulosidade), obtidas por citometria, revelam que houve mudanças no formato das células, com essa alteração proporcional ao aumento das concentrações de IC₅₀ (Figura 6). Os resultados também demonstram que houve diminuição na fluorescência dos tratamentos 2xIC₅₀ e 4xIC₅₀ quando comparadas com o controle (Figura 7). Ceole et al. (2017) relataram que células de *L. braziliensis*, quando tratadas com IC₅₀ de nerolidol, composto majoritário do óleo essencial de *Piper aduncum*, sofreram depolarização do $\Delta\psi_m$ e apresentaram tamanho reduzido. O tratamento com IC₅₀ não causou a redução da fluorescência da Rh123.

A quantificação da perda do $\Delta\psi_m$ foi feita através do cálculo do IV. Como demonstrado pela tabela 3, somente o tratamento com a IC₅₀ não causou a despolarização da membrana

mitocondrial dos parasitas, ao contrário dos tratamentos 2xIC₅₀ e 4xIC₅₀ que afetaram $\Delta\psi_m$. O controle positivo com o CCCP foi efetivo na avaliação, como demonstrado (Figura 8).

A mitocôndria é uma organela essencial para os parasitas, atuando como o mecanismo central de metabolismo energético durante fosforilação oxidativa, elétrons são movidos através da cadeia respiratória mitocondrial, estabelecendo um gradiente eletroquímico da matriz mitocondrial para o espaço de intermembranas, gerando energética celular na forma de adenosina trifosfato (ATP) (Angrimani et al., 2015; Fonseca-Silva et al., 2011). Esse processo é vital para sobrevivência das células, sendo que os efeitos da despolarização do $\Delta\psi_m$ podem levar a morte celular (Machado et al., 2014).

Diversas substâncias extraídas de plantas, como óleo essencial, extrato de plantas, dentre outras, já foram estudadas em atividades leishmanicidas, que causaram a perda do $\Delta\psi_m$ (Angrimani et al., 2015; Ceole et al., 2017; Islamuddin et al., 2014; Machado et al., 2014). Os resultados aqui obtidos sugerem que o OEVC-202 causou a inibição das promastigotas de *P. serpens* ao afetar a função mitocondrial do parasita.

4.4. Conclusões

Os OEs dos sete genótipos de *V. curassavica* apresentaram atividade antimicrobiana sobre formas promastigotas de *P. serpens*. Os efeitos morfofisiológicos observados após o tratamento com OEVC-202 nos parasitas foram a perda da integralidade da membrana celular, alteração no formato das células e a despolarização do $\Delta\psi_m$. Estratégias de aplicação do óleo essencial devem ser investigadas para melhorar a eficiência no seu uso.

4.5. Agradecimentos

Ao professor Paulo C. L. Nogueira pela ajuda na identificação dos compostos.

4.6. Financiamento

Esse estudo foi financiado em parte pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa e a Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (Fapitec/SE) – Brasil, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES – Código de financiamento 001) e Financiadora de Estudos e Projetos - Brasil (FINEP).

4.7. Referências

- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publ. Corp., Carol Stream, Chicago.
- Andrade, M.A., Azevedo, C. dos S., Motta, F.N., Santos, M.L. dos, Silva, C.L., Santana, J.M. de, Bastos, I.M.D., 2016. Essential oils: In vitro activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. BMC Complement. Altern. Med. 16, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1401-9>
- Angrimani, D.S.R., Losano, J.D.A., Rui, B.R., Bicudo, L.C., Andrade, A.F., Arruda, R.P., Celeghini, E.C.C., 2015. Ferramentas para avaliação da funcionalidade da mitocôndria espermática. Rev. Bras. Reprodução Anim. 39, 277–283.
- Araújo, J.C.A.de; Pereira, J.C.R.; Gasparotto, L, 2003. Murcha-de-Phytomonas do coqueiro no Amazonas. Circular Técnica n. 17, Embrapa, Manaus, Amazonas, Brazil.
- Azeredo, C.M.O., Santos, T.G., Maia, B.H.L. de N.S., Soares, M.J., 2014. In vitro biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. BMC Complement. Altern. Med. 14, 309. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-309>

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Basile, A., Senatore, F., Gargano, R., Sorbo, S., Del Pezzo, M., Lavitola, A., Ritieni, A., Bruno, M., Spatuzzi, D., Rigano, D., Vuotto, M.L., 2006. Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. *J. Ethnopharmacol.* 107, 240–248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.03.019>
- Batistoti, M., Cavazzana Jr., M., Serrano, M.G., Ogatta, S.F., Baccan, G.C., Jankevicius, J. V., Teixeira, M.M., Jankevicius, S.I., 2001. Genetic variability of trypanosomatids isolated from phytophagous hemiptera defined by morphological, biochemical, and molecular taxonomic markers. *J. Parasitol.* 87, 1335–1341. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[1335:GVOTIF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[1335:GVOTIF]2.0.CO;2)
- Braga, F.G., Bouzada, M.L.M., Fabri, R.L., de, M., Moreira, F.O., Scio, E., Coimbra, E.S., 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 111, 396–402. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.12.006>
- Camargo, E.P., 1999. Phytomonas and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv. Parasitol.* 42, 29–112. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60148-7](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60148-7)
- Carvalho, P.M.de, Rodrigues, R.F.O., Sawaya, A.C.H.F., Marques, M.O.M., Shimizu, M.T., 2004. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. *J. Ethnopharmacol.* 95, 297–301. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2004.07.028>
- Ceole, L.F., Cardoso, M.D.G., Soares, M.J., 2017. Nerolidol, the main constituent of *Piper aduncum* essential oil, has anti-*Leishmania braziliensis* activity. *Parasitology* 144, 1179–1190. <https://doi.org/10.1017/S0031182017000452>
- Costa, K.A.D., Ferenz, M., Silveira, S.M. da, Moura, R., Millezi, A.F., 2018. Determinação da atividade antibacteriana e antioxidante do óleo essencial das folhas de *Cymbopogon flexuosus* contra *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. do Congr. Sul Bras. Eng. Aliment.* 3, 01–07. <https://doi.org/10.5965/24473650312017003>
- Dannenberg, G. da S., Funck, G.D., Mattei, F.J., da Silva, W.P., Fiorentini, Â.M., 2016. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in vitro and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 36, 120–127. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2016.06.009>
- Ehlert, P.A.D., Blank, A.F., Arrigoni-Blank, M.F., Paula, J.W.A., Campos, D.A., Alviano, C.S., 2006. Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essencial de sete espécies de plantas medicinais. *Rev. Bras. Plantas Med.* 8, 79–80.
- Feijó, E.V.R. da S., de Oliveira, R.A., Costa, L.C. do B., 2014. Light affects *Varronia curassavica* essential oil yield by increasing trichomes frequency. *Rev. Bras. Farmacogn.* 24, 516–523. <https://doi.org/10.1016/J.BJP.2014.10.005>
- Fonseca-Silva, F., Inacio, J.D.F., Canto-Cavaleiro, M.M., Almeida-Amaral, E.E., 2011. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014666>
- Garner, D.L., Thomas, C.A., Joerg, H.W., DeJarnette, J.M., Marshall, C.E., 1997. Fluorometric Assessments of Mitochondrial Function and Viability in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. *Biol. Reprod.* 57, 1401–1406.
- Gibbs, A. J., 1957. *Leptomonas serpens* n. sp., parasitic in the digestive tract and salivary glands of *Nezara viridula* (Pentatomidae) and in the sap of *Solanum lycopersicum* (tomato) and other plants. *Parasitology*, 47(3-4), 297-303.
- Gilbert, B., Favoreto, R., 2012. Monografia: *Cordia verbenacea* DC Boraginaceae. *Rev. Fitos* 7, 17–25.
- Gonçalves, M.J., Tavares, A.C., Cavaleiro, C., Cruz, M.T., Lopes, M.C., Canhoto, J., Salgueiro, L., 2012. Composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oils of *Seseli*

- tortuosum* L. and *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* (Samp.) M. Laínz from Portugal. Ind. Crops Prod. 39, 204–209. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.025>
- Gomes, M.R.F., Schuh, R.S., Bemvenuti Jacques, A.L., Dorneles, G.G., Montanha, J., Roehe, P.M., Bordignon, S., Dallegrave, E., Leal, M.B., Limberger, R.P., 2013. Biological assessment (antiviral and antioxidant) and acute toxicity of essential oils from *Drimys angustifolia* and *D. brasiliensis*. Rev. Bras. Farmacogn. 23, 284–290. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000142>
- Ienne, S., Freschi, L., Vidotto, V.F., De Souza, T.A., Purgatto, E., Zingales, B., 2014. Auxin production by the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens* and auxin homeostasis in infected tomato fruits. Parasitology 141, 1299–1310. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000547>
- Islamuddin, M., Chouhan, G., Want, M.Y., Tyagi, M., Abdin, M.Z., Sahal, D., Afrin, F., 2014. Leishmanicidal activities of *Artemisia annua* leaf essential oil against Visceral Leishmaniasis. Front. Microbiol. 5, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00626>
- Jankevicius, J. V., Jankevicius, S. I., Campaner, M., Conchon, I., Maeda, L. A., Telxreira, M. M., Freymuller, E., Camargo, E. P., 1989. Life Cycle and Culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a Trypanosomatid Parasite of Tomatoes. The Journal of Protozoology, 36: 265-271. doi:10.1111/j.1550-7408.1989.tb05361.x
- Jaskowska, E., Butler, C., Preston, G., Kelly, S., 2015. *Phytomonas*: trypanosomatids adapted to plant environments. PLoS Pathog. 11, e1004484. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004484>
- Kitajima, E. W., Vainstein, M. H., & Silveira, J. S. M., 1986. Flagellate protozoon associated with poor development of the root system of cassava in the Espirito Santo State, Brazil. Phytopathology, 76(6), 638-642.
- Kyarimpa, C.M., Böhmendorfer, S., Wasswa, J., Kiremire, B.T., Ndiege, I.O., Kabasa, J.D., 2014. Essential oil and composition of *Tagetes minuta* from Uganda. Larvicidal activity on *Anopheles gambiae*. Ind. Crops Prod. 62, 400–404. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2014.09.006>
- Liu, C.H., Mishra, A.K., Tan, R.X., Tang, C., Yang, H., Shen, Y.F., 2006. Repellent and insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean. Bioresour. Technol. 97, 1969–1973. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.09.002>
- Lorenzi, H.; Matos, F. J. A., 2008. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 544p.
- Machado, M., Dinis, A.M., Santos-Rosa, M., Alves, V., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Sousa, M.C., 2014. Activity of *Thymus capitellatus* volatile extract, 1,8-cineole and borneol against *Leishmania* species. Vet. Parasitol. 200, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.11.016>
- Medeiros, R., Passos, G.F., Vitor, C.E., Koepp, J., Mazzuco, T.L., Pianowski, L.F., Campos, M.M., Calixto, J.B., 2007. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. Br. J. Pharmacol. 151, 618–627. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707270>
- Medina, J.M., Rodrigues, J.C.F., Moreira, O.C., Atella, G., De Souza, W., Barrabin, H., 2015. Mechanisms of growth inhibition of *Phytomonas serpens* by the alkaloids tomatine and tomatidine. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 110, 48–55. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140097>
- Michielin, E.M.Z., Salvador, A.A., Riehl, C.A.S., Smânia, A., Smânia, E.F.A., Ferreira, S.R.S., 2009. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. Bioresour. Technol. 100, 6615–6623. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.061>
- Nizio, D.A. de C., Fujimoto, R.Y., Maria, A.N., Carneiro, P.C.F., França, C.C.S., da Costa

- Sousa, N., de Andrade Brito, F., Sampaio, T.S., de Fátima Arrigoni-Blank, M., Blank, A.F., 2018. Essential oils of *Varronia curassavica* accessions have different activity against white spot disease in freshwater fish. *Parasitol. Res.* 117, 97–105. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5673-x>
- Nizio, D.A. de C., Brito, F. de A., Sampaio, T.S., Melo, J. de O., Silva, F.L.S. da, Gagliardi, P.R., Arrigoni-Blank, M. de F., Anjos, C.S. dos, Alves, P.B., Wisniewski Junior, A., Blank, A.F., 2015. Chemical diversity of native populations of *Varronia curassavica* Jacq. and antifungal activity against *Lasiodiplodia theobromae*. *Ind. Crops Prod.* 76, 437–448. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.026>
- Oliveira, B.M.S., Melo, C.R., Santos, A.C.C., Nascimento, L.F.A., Nizio, D.A.C., Cristaldo, P.F., Blank, A.F., Bacci, L., 2019. Essential oils from *Varronia curassavica* (Cordiaceae) accessions and their compounds (E)-caryophyllene and α -humulene as an alternative to control *Dorymyrmex thoracicus* (Formicidae: Dolichoderinae).
- Oliveira, J., Melo, D., Aparecida, T., Lúcia, A., Mércia, E., Cruz, O., César, H., Jesus, R. De, Barreto, P., Arrigoni-blank, M.D.F., Castro, S. De, Oliveira, R., Pereira, R., Fernandes, M., Fitzgerald, A., Scher, R., 2013. Acta Tropica Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. *Acta Trop.* 128, 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.06.024>
- Oliveira, V.C.S., Moura, D.M.S., Lopes, J.A.D., de Andrade, P.P., da Silva, N.H., Figueiredo, R.C.B.Q., 2009. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. *Parasitol. Res.* 104, 1053–1059. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1288-6>
- Passos, G.F., Fernandes, E.S., da Cunha, F.M., Ferreira, J., Pianowski, L.F., Campos, M.M., Calixto, J.B., 2007. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *J. Ethnopharmacol.* 110, 323–333. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.032>
- Pimentel, S.P., Barrella, G.E., Casarin, R.C. V., Cirano, F.R., Casati, M.Z., Foglio, M.A., Figueira, G.M., Ribeiro, F. V., 2012. Protective effect of topical *Cordia verbenacea* in a rat periodontitis model: Immune-inflammatory, antibacterial and morphometric assays. *BMC Complement. Altern. Med.* 12. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-224>
- Rodrigues, F.G., Rodrigues, F.G., Almeida, S.X., Campos, A., Oliveira, L.S., Saraiva, M., Cabral, M.S., Costa, J.G., 2012. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. *Pharmacognosy Res.* 4, 161. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.99080>
- Roldão, E. de F., Witaicenis, A., Seito, L.N., Hiruma-Lima, C.A., Di Stasi, L.C., 2008. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae). *J. Ethnopharmacol.* 119, 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.001>
- Santoro, G.F., Das Graças Cardoso, M., Guimarães, L.G.L., Salgado, A.P.S.P., Menna-Barreto, R.F.S., Soares, M.J., 2007. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol. Res.* 100, 783–790. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0326-5>
- Santos, R.P., Nunes, E.P., Nascimento, R.F., Santiago, G.M.P., Menezes, G.H.A., Silveira, E.R., Pessoa, O.D.L., 2006. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 17, 1027–1030. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532006000500030>
- Sertié, J.A.A., Woisky, R.G., Wiesel, G., Rodrigues, M., 2005. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: Oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. *Phytomedicine* 12, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.09.013>
- Silva, V.D.da, Almeida-Souza, F., Teles, A.M., Neto, P.A., Mondego-Oliveira, R., Mendes Filho, N.E., Taniwaki, N.N., Abreu-Silva, A.L., Calabrese, K. da S., Mouchrek Filho,

- V.E., 2018. Chemical composition of *Ocimum canum* Sims. essential oil and the antimicrobial, antiprotozoal and ultrastructural alterations it induces in *Leishmania amazonensis* promastigotes. Ind. Crops Prod. 119, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.005>
- Silvestri, J.D.F., Paroul, N., Czyewski, E., Lerin, L., Rotava, I., Cansian, R.L., Mossi, A., Toniazzi, G., Oliveira, D. de, Treichel, H., 2010. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). Rev. Ceres 57, 589–594. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2010000500004>
- Ueda-Nakamura, T., Mendonça-Filho, R.R., Morgado-Díaz, J.A., Korehisa Maza, P., Prado Dias Filho, B., Aparício Garcia Cortez, D., Alviano, D.S., Rosa, M. do S.S., Lopes, A.H.C.S., Alviano, C.S., Nakamura, C.V., 2006. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. Parasitol. Int. 55, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.10.006>
- Van Den Dool, H., Kratz, P.H.J., 1963. Chromatography 11 463 p.
- Weiss, J., Gaysinsky, S., Davidson, M., McClements, J. Nanostructure of encapsulation systems: food antimicrobials. In: Barbosa-Cánovas, G.V., Mortimer, A., Lineback, D., Spiess, W., Buckle, K.(eds.), IUFOST world congress book: Global issues in food science and technology (p. 425-479). Amsterdam: Elsevier INC, 2009.

TABELAS

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de sete genótipos de *Varronia curassavica* (%).

Tabela 2. Atividade antiprotozoária dos óleos essenciais de sete genótipos de *Varronia curassavica* em promastigotas de *Phytomonas serpens* com valores das IC₅₀ (µg/mL).

Tabela 3. Avaliação do Índice de variação (IV) para analisar o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de promastigotas de *Phytomonas serpens* tratadas com óleo essencial de *Varronia curassavica*, genótipo VC-202, e coradas com Rodamina 123 (Rh123).

FIGURAS

Figura 1. Efeito do OE de *Varronia curassavica*, genótipo VC-202, nas concentrações IC₅₀, 2xIC₅₀ e 4xIC₅₀ sobre a curva de crescimento de promastigotas de *Phytomonas serpens*. Dados representados pela média \pm E.P em experimentos realizados em triplicata em três dias independentes. *p < 0.05, **p < 0.01 e ***p < 0.001. (Two-way ANOVA com teste de Tukey).

Figura 2. Avaliação do efeito permanente na proliferação celular em promastigotas de *Phytomonas serpens* tratadas com IC₅₀, 2xIC₅₀ e 4xIC₅₀ do óleo essencial de *Varronia curassavica*, genótipo VC-202, comparadas com o controle. Dados representados pela média \pm E.P em experimentos realizados em triplicata em três dias independentes. *p < 0.05, **p < 0.01 e ***p < 0.001. (Two-way ANOVA com teste de Tukey).

Figura 3. Níveis de produção de Espécies Reativas a Oxigênio (ROS) em promastigotas de *Phytomonas serpens* tratadas com IC₅₀, 2xIC₅₀ e 4xIC₅₀ do óleo essencial de *Varronia curassavica*, genótipo VC-202, comparados com o controle. Dados de média de fluorescência relativos ao controle negativo, representados pela média \pm E.P em experimentos realizados em triplicata em três dias independentes. *p < 0.05, **p < 0.01 e ***p < 0.001. (two-way ANOVA com teste de Tukey).

Figura 4. Intensidade da fluorescência em promastigotas de *Phytomonas serpens* tratadas com a IC₅₀ e 2xIC₅₀ do óleo essencial de *Varronia curassavica*, genótipo VC-202, marcadas com iodeto de propídio (PI). Células incubadas no banho-maria (80°) foram usadas como controle positivo e células não tratadas como controle negativo. Dados de média de fluorescência relativos ao controle negativo, representados pela média \pm E.P em experimentos realizados em triplicata em três dias independentes. *p < 0.05, **p < 0.01 e ***p < 0.001. (two-way ANOVA com teste de Tukey).

Figura 5. Imagens de microscopia (40x) de fluorescência de promastigotas de *Phytomonas serpens* tratadas com IC₅₀ e 2xIC₅₀ do óleo essencial de *Varronia curassavica*, genótipo VC-202. (A, B e C) Células tratadas com IC₅₀ do óleo essencial de *Varronia curassavica*, genótipo VC-202, coradas com DAPI e iodeto de propídio (PI) com imagens sobrepostas (MERGE), respectivamente; (D, E e F) Células tratadas com 2xIC₅₀ do óleo essencial de *Varronia curassavica*, genótipo VC-202, coradas com DAPI e iodeto de propídio (PI) com imagens sobrepostas (MERGE), respectivamente; (G, H e I) Células mortas em banho-maria (80° \pm 10 min) coradas com DAPI e iodeto de propídio (PI) com imagens sobrepostas (MERGE), respectivamente; (J, K e L) Células vivas coradas com DAPI e iodeto de propídio (PI) com imagens sobrepostas (MERGE), respectivamente. Imagens representativas de três experimentos independentes.

Figura 6. Imagem representativa da região da população de promastigotas de *Phytomonas serpens* (FSC - Tamanho x SSC - Granulosidade) tratadas com IC₅₀, 2xIC₅₀ e 4xIC₅₀ do óleo essencial de *Varronia curassavica*, genótipo VC-202. (A) Células vivas (Sem Rh123); (B) Controle negativo; (C) Células tratadas com CCCP; (D) Células tratadas com IC₅₀ do óleo essencial de *Varronia curassavica*, genótipo VC-202; (E) Células tratadas com 2xIC₅₀ do óleo essencial de *Varronia curassavica*, genótipo VC-202; (F) Células tratadas com 4xIC₅₀ do óleo essencial de *Varronia curassavica*, genótipo VC-202. Imagens representativas de três experimentos independentes.

Figura 7. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de promastigotas de *Phytomonas serpens* tratadas com a IC₅₀, 2xIC₅₀ e 4xIC₅₀ do óleo essencial de *Varronia curassavica*, genótipo VC-202 e CCCP, comparados com Controle Negativo e coradas com Rodamina 123 (Rh123).

Tabela 1.

Nº	Constituinte	IRR1	Genótipos						
			VC-002	VC-104	VC-202	VC-302	VC-303	VC-601	VC-701
1	Triciclono	921	0	0	0	0	0	0	0,61
2	α -tujeno	924	0	0	0	0	0	1,51	0
3	α -pineno	932	56,69	0	0	1,94	0	0,46	0,36
4	Canfeno	946	0,43	0	0	0	0	0	0
5	Sabineno	969	0,36	0	0	0,41	0	18,26	0,13
6	β - pineno	974	0,33	0	0	0,24	0	0,75	0
7	p-cimeno	1020	0	0	0	0	0	0,77	0
8	o-cimeno	1022	0	0	0	0,14	0	0	0
9	limoneno	1024	0	0	0	0	0	0,92	0
10	β -felandreno	1025	0,79	0	0	2,64	0	0	0,42
11	1,8-cineol	1026	0,4	0	0	1,03	0	0,46	0,45
12	γ -terpineno	1054	0	0	0	0	0	1,11	0
13	hidrato de cis-sabineno	1065	0	0	0	0	0	1,34	0
14	terpinoleno	1086	0	0	0	0	0	0,26	0
15	hidrato de trans-sabineno	1098	0	0	0	0	0	1,15	0
16	cis-p-ment-2-en-1-ol	1118	0	0	0	0	0	0,32	0
17	trans-pinocarveol	1135	0,25	0	0	0	0	0	0
18	cis-verbenol	1137	0,12	0	0	0	0	0	0
19	terpinen-4-ol	1174	0	0	0	0	0	4,24	0
20	acetato de isobornil	1287	0,72	0	0	0	0	0	0
21	δ -elemeno	1335	0,91	0,27	2,24	0,09	0,08	1,41	0
22	trans-p-ment-2-en-1-ol	1336	0	0	0	0	0	0,19	0
23	α -cubebeno	1345	0	0	0	0	0	1,69	0
24	ciclosativeno	1369	0,21	0	0	0	0	0	0
25	α -ilangeno	1373	0	0	0,33	0,11	0	0	0
26	α -copaeno	1374	0,74	0	0	0	0	0,73	0
27	β -bourboneno	1387	0	0	0,43	0	0	0,38	0
28	β -elemeno	1389	1,38	0,19	1,28	0,24	0,44	1,9	0,15
29	α -gurjuneno	1409	0	0,27	0,45	0,58	0,24	0,29	0,18
30	E-cariofileno	1417	9,78	1,46	6,16	16,47	7,88	21,78	5,17
31	β -copaeno	1430	0	0	0,31	0	0	0,6	0
32	α -trans-bergamoteno	1432	0	0	0	2,57	0,93	0	1,84
33	γ -elemeno	1434	0	0	0	0,79	0,41	0	0,64
34	Aromadendreno	1439	0	0	0	0	0	0,32	0
35	trans- β -farnezeno	1440	0	0	0	0,87	0	0	0,54
36	cis-murolo-3,5-dieno	1448	0	0	0	0	0	1,32	0
37	α -humuleno	1452	1,84	0,61	1,94	4,98	2,02	4,5	1,59
38	Aloaromadendreno	1458	7,79	1,25	1,84	0,26	0,91	0,39	0
39	cis-muurolo-4(14)5-dieno	1465	0	0	0	0	0,47	0	0
40	Shiobunona isômero I	1473	0	0	0	0	0,47	0	0
41	trans-cadina-1(6),4-dieno	1475	0	0	0	0	0	0,2	0
42	γ -murolo	1478	0,48	0	0,40	0	0	0,51	0
43	ar-curcumeno	1479	0	0	0	20,37	1,26	0	2,71
44	γ -curcumeno	1481	0	0	0	0	0	0	0,38
45	Germacreno-D	1484	1,81	0	1,95	1,93	0,93	4,26	0,39
46	β -selineno	1489	0	0	0	0	0,58	0,62	0
47	epi-cubebol	1493	0	0	0	7,74	0,6	1,32	0,76
48	Biciclogermacreno	1500	5,35	1,93	4,37	0,93	0	8,26	0
49	β -bisaboleno	1505	0	0	0	5,81	0	0	1,21
50	Shyobunone isômero II	1511	0	0,5	0	0	1,64	0	0
51	γ -cadineno	1513	0	0	0,66	0	0	0	0
52	Cubebol	1514	0,8	0	0	0	0	1,01	0
53	β -sesquifelandreno	1521	0	0	0	18,53	0	0	1,91

N°	Constituinte	IRRI	Genótipos						
			VC-002	VC-104	VC-202	VC-302	VC-303	VC-601	VC-701
54	δ-cadineno	1522	1,95	0	0	0	0	5,36	0
55	cis-iso-γ-bisaboleno	1528	0	0	0	0	0	0	0,42
56	Epizonarene	1530	0	0	16,67	0	0	0	0
57	trans-nerolidol	1531	0	0	8,7	0	0	0	0
58	10-epi-cubebol	1533	0	0	0	0	0	1,8	0
59	α-cadineno	1537	0	0	0,34	0	0	0	0
60	Shyobunona isômero III	1539	0	0	0	0	3,31	0	0
61	cis-nerolidol	1561	0	0	0	0,77	0	0	0,56
62	Germacreno D-4-ol	1574	0,21	1	32,16	0	1,04	0	0
63	Espatulanol	1577	2,14	3,37	0	3,58	2,83	2,71	3,1
64	Oxido de cariofileno	1582	1,04	0,71	0	3,78	3,06	2,02	5,39
65	Globulol	1590	0,26	0	2,99	0	0	0	6,64
66	Viridiflorol	1592	0	0	0,56	0,89	0	0,33	0
67	7-ciclododecen-1-ona,7-metil-3-metileno-10-(1-propil)	1595	0	48,63	0	0	19,32	0	0,69
68	Ledol	1602	0,7	0	2,25	0	0	0,61	0
69	Epóxido de humuleno II	1608	0,29	0	0	0,98	0	0,43	1,14
70	Helifolen-12-ol-D	1619	0	0	0	0	0	0	9,31
71	Eremoligenol	1626	0	0	1,03	0	0	0	0
72	1-epi-cubenol	1627	0	0	0,35	0	0	0,52	0
73	α-acorenol	1632	0,35	0	0	0	1,53	0	1,11
74	Epoxido allo-aromadendreno	1639	0	0	0	0	0	0,59	0
75	epi-α-muurolol	1640	0	0	3,86	0	1,54	0	0
76	α-muurulol	1644	0,8	0	0	0	0	0	0
77	Cubenol	1645	0,55	0	0	0	3,23	1	0
78	α-turmerona	1649	0	0	0	0	0	0	6,86
79	α-cadinol	1652	0,52	0,75	4,21	0	0	0,34	0
80	selin-11-en-4-α-ol	1658	0	0	0	0	0	0,28	0
81	ar-turmerona	1668	0	0	0	0	6,54	0	28,36
82	β-turmerona	1680	0	0	0	0	0	0	3,61
83	Shyobunol	1688	0	1,63	3,83	0	4,28	0	0
84	cis-α-atlantone	1777	0	0	0	0	0,99	0	1,16
	Monoterpenos (%)	-	60,09	0	0	6,40	0	31,55	1,97
	Sesquiterpenos(%)	-	39,90	62,57	99,31	92,27	66,53	67,67	85,82
	Total (%)	-	99,99	62,57	99,31	98,67	66,53	99,22	87,79

IR_{LIT}: Índice de retenção dado pela literatura (Adams, 2007).

Tabela 2.

Genótipo	IC ₅₀ (µg/mL)
VC-002	28,56±4,10
VC-104	42,77±8,75
VC-202	13,94±2,24
VC-302	25,85±5,04
VC-303	18,09±2,14
VC-601	40,02±5,71
VC-701	19,00±4,42
Anfotericina B	1,06±0,09

Dados representados pela média ± E.P. em experimentos realizados em triplicata em três dias independentes. IC₅₀: Concentração que inibiu 50% das células.

Tabela 3.

	Média da fluorescência de Rh123	IV
Controle negativo	7686 ± 682	0
CCCP	2459 ± 240	-0,6801
IC ₅₀	8443 ± 176	0,0984
2xIC ₅₀	6807 ± 402	-0,1144
4xIC ₅₀	4775 ± 773	-0,3787

Dados representados pela média \pm E.P em experimentos realizados em triplicata em três dias independentes.

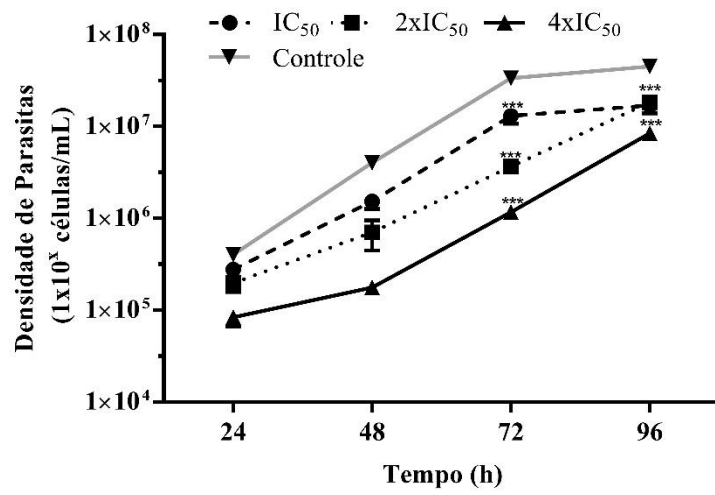


Figura. 1.

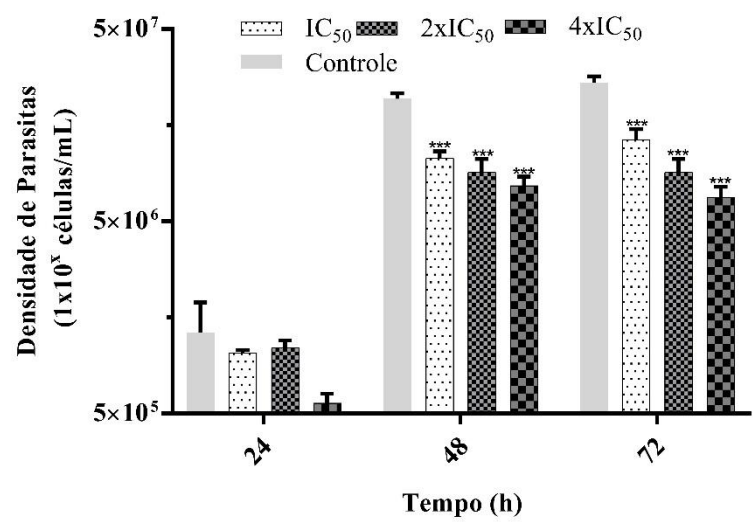


Figura 2.

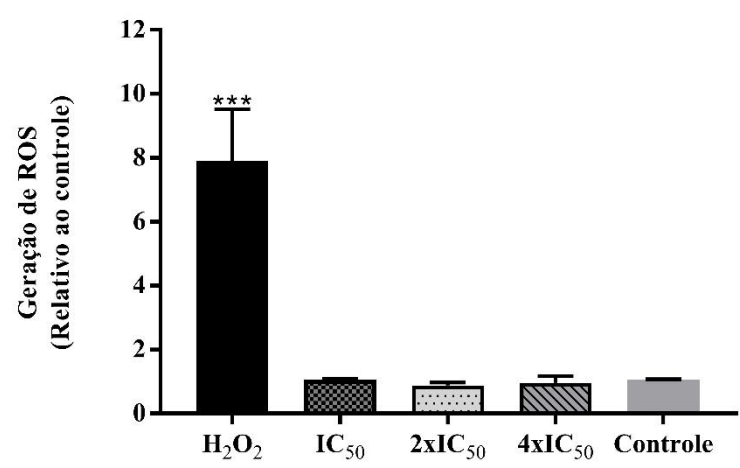


Figura 3.

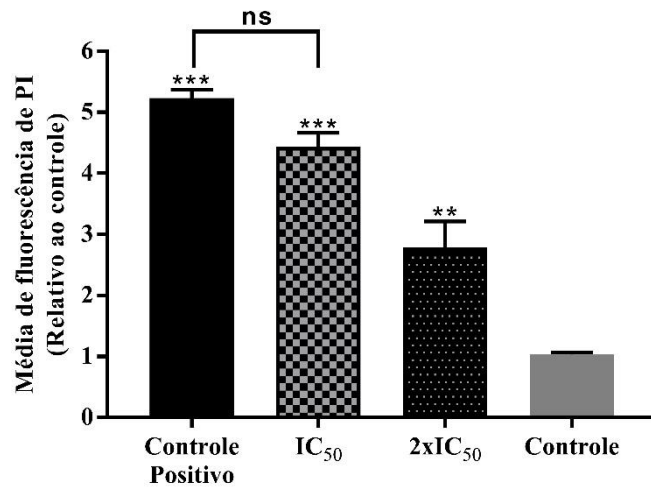


Figura 4.

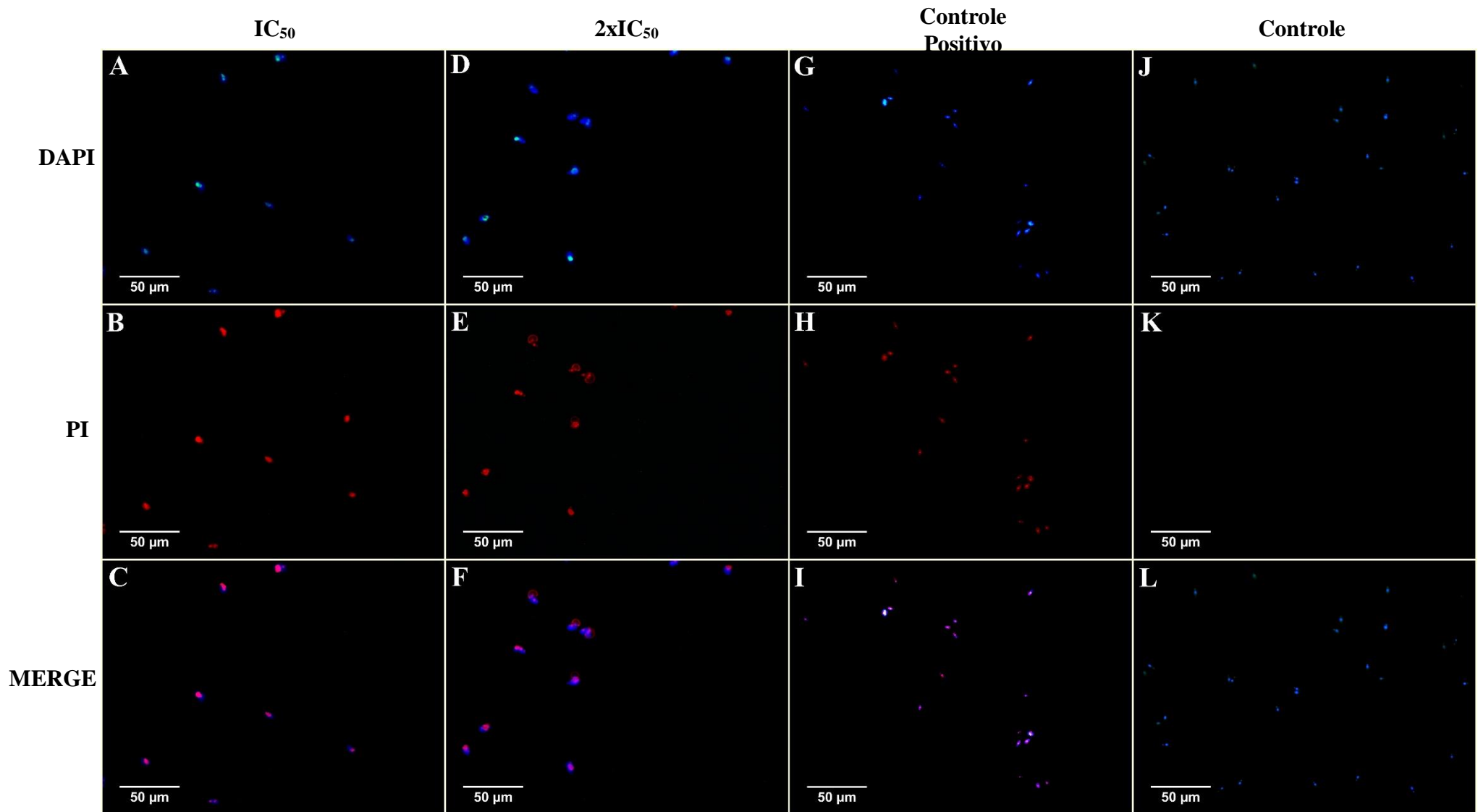
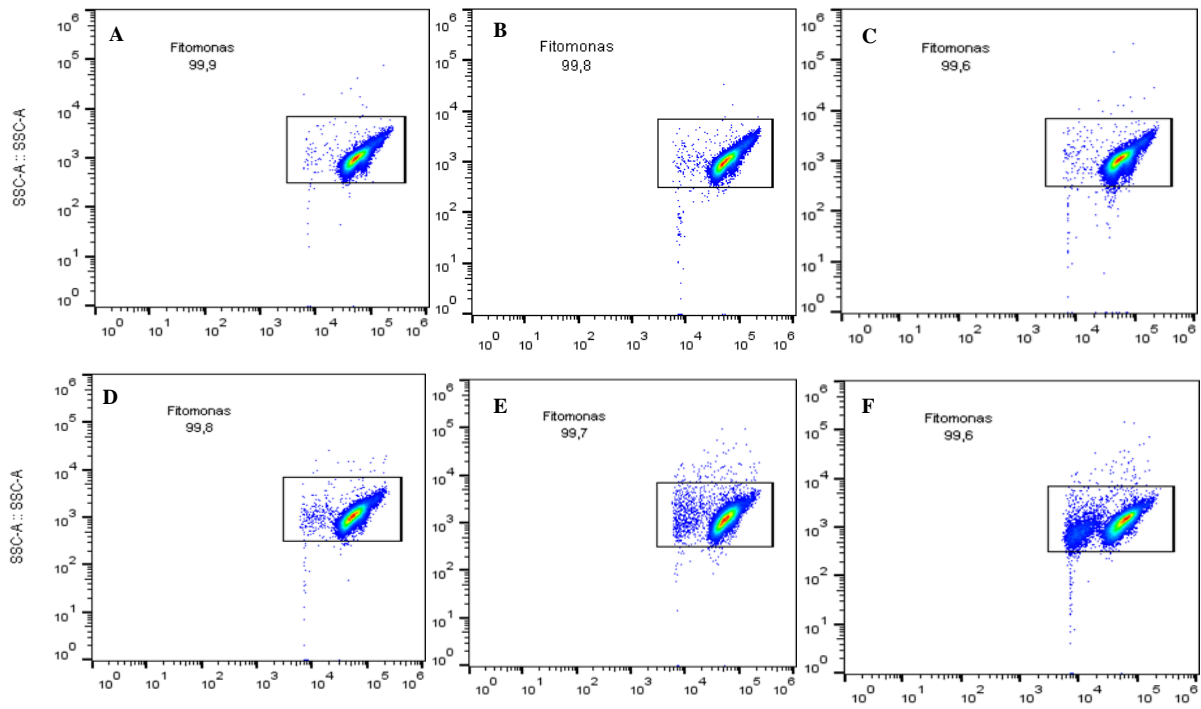
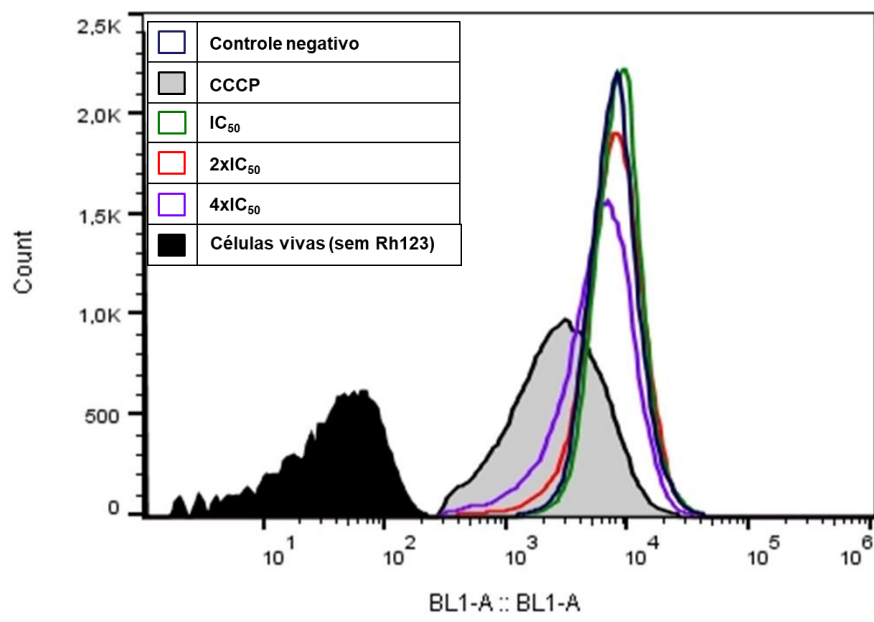


Figura 5

**Figura 6**

**Figura 7**